

Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente  
Vestiging Aalsmeer  
Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer  
Tel. 0297-352525, fax 0297-352270

ISSN 1385 - 3015

## **WATERONTSMETTINGSMETHODIEKEN TEGEN WORTELAALTJES**

*Verhitting, UV-straling, ozon, waterstofperoxide en langzame zandfiltratie*

Project 337-2804

J.J. Amsing  
W.Th. Runia  
Aalsmeer, januari 2000

Rapport 228  
Prijs f 30,00

Rapport 228 wordt u toegestuurd na storting van f 30,00 op banknummer  
300 177 976 ten name van Proefstation Aalsmeer onder vermelding van 'Rapport  
228, Waterontsmettingsmethodieken tegen wortelaaltjes'.

971261

# INHOUD

<b>SAMENVATTING</b>	<b>5</b>
<b>1. INLEIDING</b>	<b>7</b>
1.1 Probleemstelling	7
1.2 Doelstelling	7
1.3 Indeling rapport	8
<b>2. ALGEMENE PROEFFACTOREN</b>	<b>9</b>
<b>3. VERHITTING</b>	<b>11</b>
3.1 Materialen en methoden	11
3.2 Resultaten en discussie	12
3.3 Conclusies	19
<b>4. UV-STRALING</b>	<b>20</b>
4.1 Materialen en methoden	20
4.2 Resultaten en discussie	22
4.3 Conclusies	26
<b>5. OZONISATIE</b>	<b>27</b>
5.1 Materialen en methoden	27
5.2 Resultaten en discussie	28
5.3 Conclusies	32
<b>6. WATERSTOFFEROXIDE</b>	<b>33</b>
6.1 Materialen en methoden	33
6.2 Resultaten en discussie	34
6.3 Conclusies	36
<b>7. LANGZAME ZANDFILTRATIE</b>	<b>37</b>
7.1 Materialen en methoden	37
7.2 Resultaten en discussie	39
7.3 Conclusies	43
<b>8. OVERZICHT ONTSMETTINGSMETHODIEKEN</b>	<b>44</b>
<b>DANKWOORD</b>	<b>46</b>
<b>LITERATUUR</b>	
- Gerefereerde literatuur	47
- Gepubliceerde artikelen	48

## SAMENVATTING

Gebruik van water, dat besmet is met wortelpathogenen, houdt een groot risico in op verspreiding van ziekten. Dit risico kan worden voorkomen door het water te ontsmetten. In de jaren 1992 tot 1998 is onderzocht door middel van welke ontsmettingsmethodieken het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* in water kan worden uitgeschaald. De onderzochte ontsmettingsmethodieken zijn verhitting, ultraviolette (UV) straling, ozon, waterstofperoxide en langzame zandfiltratie. De meest effectieve methodieken zijn verhitting en UV-straling. Verhitting bij 52,5°C gedurende 30 seconden is al dodelijk. Een UV-behandeling met een geschatte dosis van ongeveer 10 mJ/cm<sup>2</sup> is weliswaar niet dodelijk, maar *R. similis* wordt steriel, waardoor vermeerdering uitblijft. Ook ozon en waterstofperoxide kunnen 100% effectief zijn, maar de ontsmettingsvoorwaarden waaraan dan moet worden voldaan, zijn moeilijk aan te geven omdat de aard en de hoeveelheid oxideerbare stoffen in het water niet bekend zijn. Bovendien zijn onder gunstige omstandigheden de minimale ontsmettingsvoorwaarden al dermate hoog ( $\geq 20$  g ozon/m<sup>3</sup> per uur en  $\geq 200$  dpm waterstofperoxide gedurende 24 uur) dat ontsmetting door middel van ozon en waterstofperoxide minder rendabel is dan door middel van verhitting en UV-straling. Langzame zandfiltratie met een zandfractie van 0,15 tot 0,8 mm en een doorstroomsnelheid van 100 liter drainwater/m<sup>2</sup> zandoppervlakte per uur laat *R. similis* door en komt dus niet als ontsmettingsmethodiek in aanmerking.

# 1. INLEIDING

## 1.1 PROBLEEMSTELLING

De Structuurnota Landbouw van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij geeft aan dat de glastuinbouw in het jaar 2000 volledig los van de ondergrond moet plaatsvinden (Anonymous, 1989). Dit betekent dat water met meststoffen en gewasbeschermingsmiddelen niet meer mag worden uitgespoeld naar de ondergrond en het oppervlaktewater, maar moet worden gerecirculeerd.

Met het overschakelen van teelten in de grond naar teelten in substraten los van de ondergrond leken aanvankelijk de grondgebonden problemen tot het verleden te behoren. Naarmate de tijd echter verstreek dienden zich niet alleen nieuwe problemen aan, maar staken ook oude problemen weer de kop op. Problemen met wortelziekten veroorzaakt door *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Cylindrocarpon destructans*, *Cylindrocladium scoparium*, *Fusarium oxysporum* en *Verticillium spp.* worden in bloemisterij- en groentegewassen, geteeld in systemen los van de ondergrond, regelmatig aangetroffen. Behalve schimmels wordt de laatste jaren ook steeds vaker melding gemaakt van de aanwezigheid van wortelaaltjes in kunstmatige substraten. Van de volgende gewassen zijn meldingen van aaltjes bekend: roos (*Pratylenchus penetrans*, *P. vulnus* en *Meloidogyne hapla*), Anthurium andreanum (*Radopholus similis*), Bouvardia (*Meloidogyne incognita*) en Gerbera (*M. incognita*). Omdat de schimmels en wortelaaltjes in het algemeen gemakkelijk in het drainwater terechtkomen, is de kans op verspreiding groot als besmet drainwater wordt gerecirculeerd. Om elk risico van ziekteverspreiding uit te sluiten, moet het drainwater worden ontsmet. Onderzoekster Runia (PBG, locatie Naaldwijk) heeft veel onderzoek gedaan naar het ontsmetten van drainwater tegen schimmels en virussen. De volgende methodieken en middelen zijn de afgelopen jaren tegen deze plantpathogenen getest: verhitting, ultraviolette (UV) straling, ozon, waterstofperoxide, langzame zandfiltratie, jodium en ultrafiltratie. Het onderzoek aan ontsmetting door middel van jodium en ultrafiltratie is vanwege technische problemen vroegtijdig beëindigd. Het onderzoek heeft ertoe geleid dat thans verhitting, UV-straling en ozon veel gebruikte ontsmettingsmethodieken zijn. Vanwege de geringere kosten heeft ook langzame zandfiltratie ingang gevonden in de praktijk, maar dit is in tegenstelling tot verhitting, UV-straling en ozon selectief. Alleen verspreiding van de schimmelziekten *Pythium* en *Phytophthora* wordt door langzame zandfiltratie voorkomen.

In aansluiting op het ontsmettingsonderzoek tegen schimmels en virussen zijn ook de aaltjes in het onderzoek betrokken. Hierover was tot dan toe weinig bekend. In het buitenland was alleen onderzoek gedaan naar toepassing van verhitting en UV tegen aaltjes. Op de resultaten van het buitenlandse onderzoek is in de betreffende hoofdstukken ingegaan. Vanaf 1992 tot 1998 is door het proefstation, al dan niet in samenwerking met andere instanties, de effectiviteit onderzocht van verhitting, UV, ozon, waterstofperoxide en langzame zandfiltratie tegen het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* in voedingsoplossing. In dit rapport is hiervan verslag gedaan.

## 1.2 DOELSTELLING

Nagaan of de vijf onderzochte ontsmettingsmethodieken verhitting, UV, ozon, waterstofperoxide en langzame zandfiltratie in staat zijn drainwater met het wortelnecrose-aaltje *R. similis* zodanig te ontsmetten dat verspreiding van een aaltjesaantasting na

hergebruik wordt voorkomen. Tevens moet het onderzoek informatie opleveren over de ontsmettingsvoorwaarden waaraan dan moet worden voldaan.

### **1.3 INDELING RAPPORT**

Na de inleiding in hoofdstuk 1 worden in hoofdstuk 2 onderwerpen met betrekking tot materialen en methoden behandeld die voor meer dan één ontsmettingsmethodiek geldend zijn. Daarna volgt de bespreking van het onderzoek aan de ontsmettingsmethodieken. Achtereenvolgens komen in de hoofdstukken 3 tot en met 7 verhitte, UV-straling, ozonisatie, waterstofperoxide en langzame zandfiltratie aan de orde. Hoofdstuk 8 bevat een overzicht van de resultaten van alle onderzochte ontsmettingsmethodieken. Tevens is in dit hoofdstuk de effectiviteit van het ontsmetten tegen schimmels en bacteriën vergeleken met de effectiviteit tegen wortelaaltjes. Aan het eind van dit rapport is aangegeven welke literatuur is geraadpleegd en tot welke publicaties het onderzoek naar ontsmetting tegen aaltjes heeft geleid.

## 2. ALGEMENE PROEFACTOREN

In dit hoofdstuk wordt ingegaan op die delen van het onderzoek die algemeen geldend zijn voor alle ontsmettingsmethodieken. Het betreft het kweken van aaltjes, het telen en inoculeren van *Anthurium* en het beoordelen van de effectiviteit van de ontsmetting.

### *Kweken van R. similis*

Het onderzoek is uitgevoerd met het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis*. Dit wortelaaltje is op veel *Anthurium*-bedrijven aanwezig. Voor het onderzoek zijn aaltjes gekweekt op schijfjes wortel (*Daucus carota*) in steriele petrischalen met wateragar, zoals is beschreven door Kaplan en Davis (1990). Het voordeel van deze kweekmethode boven het kweken in planten is, dat de aaltjespopulatie dan slechts uit één soort aaltje bestaat. Worden planten gebruikt voor het kweken van aaltjes, dan bevat de aaltjespopulatie niet alleen het te kweken aaltje, maar ook allerlei saprofage aaltjes. De aaltjes waarmee de kweken zijn opgezet, waren afkomstig uit wortels van *Anthurium andrea-num*. Nadat de aaltjes uitwendig gedurende vier minuten waren ontsmet in een oplossing van 0,01%  $\text{HgCl}_2$  en 0,2% streptomycinesulfaat in gedemineraliseerd steriel water (demi-water) zijn de aaltjes over een 25  $\mu\text{m}$ -zeefje gegoten en met 600 ml steriel demi-water schoon gespoeld. Met behulp van 80 ml steriel demi-water zijn de aaltjes van het omgekeerde zeefje gespoeld. De gewassen wortels hebben zowel voor als na het schillen gedurende één minuut in 95% alcohol gestaan, waarna ze zijn afgevlamd. De aldus geprepareerde wortels zijn in 8-10 mm dikke schijfjes gesneden en zijn aan de bovenzijde van een klein holletje voorzien. Hierin is 50  $\mu\text{l}$  aaltjessuspensie gepipetteerd. Op deze wijze zijn per wortelschijfje 40 tot 60 uitwendig ontsmette *R. similis* aangebracht. De schalen zijn met tape gedicht en in het donker geplaatst bij een temperatuur van 26°C. Na een kweekperiode van twaalf weken zijn de schijfjes en de agarbodems met een mes in stukjes van 1 mm gesneden en in water gelegd. Na veertig uur is alles over een zeef gegoten en zijn de aaltjessuspensies met behulp van de wattenfiltermethode geëxtraheerd (Southey, 1986). Door gebruik van wattenfilters wordt zoveel mogelijk voorkomen dat er dode aaltjes in de extractieschalen terechtkomen. Vierentwintig uur later zijn de schalen afgegoten. Met behulp van een binoculair met onderbelichting is het aantal *R. similis* (juvenielen en volwassen aaltjes) in de suspensie geteld en het bewegend vermogen (zie 'beoordelen effectiviteit') vastgesteld.

### *Teelt van Anthurium*

Om het effect van de ontsmetting vast te kunnen stellen, zijn planten besmet met de behandelde aaltjes. Het gewas dat daarvoor is gebruikt, was *Anthurium andreanum* cv. Acropolis. De in weefselkweek vermeerderde planten zijn op het proefstation opgepot in Ø 14 cm-containers (1,3 liter). Het substraat was Jongkind potgrond nr. 6. De planten werden geteeld in kas L119 met een luchttemperatuur van 21°C (nacht) en 23°C (dag).

### *Inoculeren van Anthurium*

Eén week na het oppotten zijn de anthuriums geïnoculeerd met de al dan niet behandelde aaltjes. Per plant is 100 ml aaltjessuspensie aangebracht. Deze hoeveelheid is verdeeld over vier plaatsen in het substraat aangebracht. De injectiediepte was 3 tot 4 cm en de afstand tot de plantvoet bedroeg ongeveer 5 cm. Hoeveel planten er per behandeling zijn geïnoculeerd en om welke hoeveelheden *R. similis* het ging, is bij de verschillende ontsmettingsmethodieken aangegeven.

### *Beoordelen effectiviteit*

De effectiviteit van het ontsmetten is op twee manieren beoordeeld. Op de eerste plaats door de aaltjes op één of meer dagen na het ontsmetten te beoordelen op het bewegend vermogen. Daarvoor is een binoculair gebruikt met onderbelichting. Met betrekking tot het bewegend vermogen zijn de aaltjes in drie categorieën ingedeeld.

1. Spontaan bewegende aaltjes. Dit zijn aaltjes, die liggend in het water uit zichzelf bewegen, dus bewegen zonder aanraking.
2. Aaltjes, die alleen na aanraking bewegen.
3. Dode aaltjes, dat wil zeggen niet bewegend na aanraking.

De tweede manier waarop de effectiviteit van het ontsmetten is beoordeeld, is gebeurd door de planten dertien tot veertien weken na het inoculeren te bemonsteren. Daarvoor zijn alle wortels van de planten verwijderd, van substraat ontdaan en in stukjes van 1 cm geknipt. Na het bepalen van het vers wortelgewicht, is per plant een wortelmonster van 20 g genomen. De monsters zijn volgens de mixer/wattenfiltermethode verwerkt (Stermerding, 1964). Na een extractieduur van één dag bij een temperatuur van 20°C zijn de extractieschalen afgegoten en is het aantal *R. similis* in de suspensies geteld. Bij een aantal ontsmettingsmethodieken zijn op basis van het bewegend vermogen de dodingspercentages berekend. Daarvoor is de volgende formule gebruikt.

$$\text{Doding (\%)} = [(D_b - D_o)/L_o] \times 100 \quad (\text{formule 1})$$

$D_b$  = aantal dode aaltjes in de behandeling;  $D_o$  = aantal dode aaltjes in 'Onbehandeld' en  $L_o$  = aantal levende aaltjes in 'Onbehandeld'. Een aaltje is als levend aangemerkt wanneer het spontaan bewoog of tot beweging kwam na aanraking. Het dodingspercentage geeft het bestrijdingseffect aan.

In een aantal gevallen is het bestrijdingseffect ten opzichte van 'Onbehandeld' bepaald op basis van het spontaan bewegend vermogen en/of de wortelaantasting. De bestrijdingseffecten op basis van het spontaan bewegend vermogen zijn berekend volgens formule 2.

$$\text{Bestrijdingseffect (\%)} = [(S_o - S_b)/S_o] \times 100 \quad (\text{formule 2})$$

$S_o$  = aantal spontaan bewegende aaltjes in 'Onbehandeld' en  $S_b$  = aantal spontaan bewegende aaltjes in de behandeling. Zijn de bestrijdingseffecten berekend op basis van de wortelaantasting, dan is daarvoor formule 3 gebruikt.

$$\text{Bestrijdingseffect (\%)} = [(A_o - A_b)/A_o] \times 100 \quad (\text{formule 3})$$

$A_o$  = aantal *R. similis* per 10 g wortels in 'Onbehandeld' en  $A_b$  = aantal *R. similis* per 10 g wortels in de behandeling.

### 3. VERHITTING

Voor een algehele ontsmetting van voedingsoplossing tegen schimmels, bacteriën en virussen door middel van verhitting wordt een temperatuur geadviseerd van 95°C en een behandel tijd van 30 seconden (Runia, 1988). In aansluiting hierop is onderzoek gestart naar het effect van verhitting van voedingsoplossing om aaltjes onschadelijk te maken. In de eerste twee proeven is nagegaan wat het effect is van korte behandel tijden, namelijk 10 en 30 seconden. Daarna zijn drie proeven uitgevoerd waarin is nagegaan welke behandel tijden nodig zijn om aaltjes uit te schakelen bij temperaturen tussen 42 en 55°C. Het onderzoek bij lage temperaturen dient ervoor om het systeem ter verhitting van voedingsoplossing voor ontsmetting tegen aaltjes te optimaliseren. Zijn lagere ontsmettingstemperaturen een optie, dan kan de eigen verwarmingsketel worden gebruikt, waardoor de kosten van ontsmetting lager uitvallen. Het onderzoek is in 1994 en 1995 uitgevoerd in een warmwaterbak op het PBG in Aalsmeer. In 1999 wordt het onderzoek bij lagere temperaturen voortgezet in een verhittingsapparaat welke in de praktijk wordt gebruikt. Runia (1998) heeft het effect van verhitting vastgesteld tegen schimmels bij temperaturen van 80-95°C. Bij 80°C en de kortste behandel tijd van 45 seconden werd volledige afdoding van *Fusarium* verkregen. In 1999 wordt de afdoding van schimmels bij nog lagere temperaturen voortgezet. Het doel van dit onderzoek is nagaan hoe lang aaltjes in voedingsoplossing aan verschillende temperaturen moeten worden blootgesteld om ze onschadelijk te maken.

#### 3.1 MATERIALEN EN METHODEN

De verhittingsproeven zijn uitgevoerd in 35 ml-glazen buizen, gevuld met 20 ml voedingsoplossing, die met HNO<sub>3</sub> is aangezuurd tot een pH van 4,2. Deze pH komt overeen met de pH die in de praktijk in verhittingsapparatuur wordt gebruikt. De buizen stonden in een warmwaterbak met thermostaatregeling met een nauwkeurigheid van ± 0,1°C. Het niveau in de buizen bevond zich 2 cm onder het waterniveau in de bak. Nadat de voedingsoplossing in de buizen de gewenste temperatuur had bereikt, is 0,5 ml aaltjessuspensie van 20°C toegevoegd. Afhankelijk van de proef zijn per buis 8000 tot 20.000 duizend larven en volwassen *R. similis* gepipetteerd. Na het verstrijken van de behandel tijd is de inhoud van de buizen over een 25 µm-zeef uitgegoten en direct nagespoeld met 100 ml water van 20°C. De aaltjes zijn met 50 ml voedingsoplossing (pH 5,5) van de omgekeerde zeef gespoeld. In alle proeven zijn de opgevangen aaltjes-suspensies onderzocht op het bewegend vermogen van *R. similis*. Daarvoor zijn op verschillende tijdstippen 2x100 aaltjes gecontroleerd. In een aantal proeven zijn met de behandelde aaltjes planten van *Anthurium andreanum* cv. *Acropolis* geïnoculeerd. Veertien weken later zijn de wortels bemonsterd en met behulp van de mixer-/wattenfiltermethode onderzocht op aantallen *R. similis*.

##### *Korte behandel tijden: 10 en 30 seconden*

Op basis van het advies van 95°C gedurende 30 seconden om schimmels en virussen in voedingsoplossing onschadelijk te maken, is onderzocht welke temperaturen nodig zijn om bij behandel tijden van 10 en 30 seconden aaltjes in voedingsoplossing uit te schakelen. Temperaturen van 40 tot 90°C zijn onderzocht. Vanaf 40 tot 60°C zijn intervallen van 5 °C gebruikt en vanaf 60 tot 90 °C intervallen van 10 °C. Elke combinatie van temperatuur en tijd is één keer uitgevoerd. Direct na het behandelen zijn de aaltjes gecontroleerd op het bewegend vermogen en zijn met de aaltjes planten geïnoculeerd



(drie planten per behandeling). In de eerste proef zijn per plant gemiddeld 2.228 *R. similis* toegediend en in de tweede proef gemiddeld 5.130 *R. similis*. Veertien weken na het inoculeren zijn de wortels van de planten bemonsterd en onderzocht op aantallen *R. similis*. De proef is één keer herhaald.

#### *Lage temperaturen: 42 tot 55°C*

Het onderzoek bij lage temperaturen is gestart met een oriënterende proef *in vitro* om vast te stellen welke behandelzeiten nodig zijn om aaltjes te doden. Daarna zijn de twee hieronder beschreven proeven uitgevoerd. In beide proeven zijn temperaturen van 42 tot 55°C onderzocht. Alleen in de eerste proef zijn planten geïnoculeerd (twee planten per behandeling). Veertien weken na het inoculeren zijn de wortels van de planten bemonsterd en onderzocht op aantallen *R. similis*. Een klein gedeelte van de aaltjessuspensies is bewaard om het verloop in het bewegend vermogen van de aaltjes vast te stellen. Om dezelfde reden zijn ook de suspensies van de tweede proef bewaard. De suspensies zijn bewaard bij 15°C (proef 1) en 20°C (proef 2).

### 3.2 RESULTATEN EN DISCUSSIE

#### *Korte behandelzeiten: 10 en 30 seconden*

In Tabel 1 zijn de resultaten opgenomen betreffende het bewegend vermogen binnen één dag na het behandelen en de verse wortelgewichten en de aantallen *R. similis* in de wortels van *Anthurium andreanum* cv. *Acropolis* veertien weken na het inoculeren. Op basis van de besmettingen in de wortels zijn de bestrijdingseffecten van de behandelingen berekend. De resultaten van de behandelingen bij temperaturen hoger dan 55°C zijn niet in de tabel opgenomen, omdat deze dezelfde waren als bij 55°C.

*Tabel 1* - Ontsmetting van voedingsoplossing door middel van verhitting tegen het wortelneurose-aaltje *Radopholus similis* (R.s.) (n = 2)

Behandeling (°C / sec.)	ÉÉN DAG NA HET BEHANDELEN			14 WEKEN NA INOCULEREN		
	Aantal R.s.	% Bewegend totaal	spontaan	Vers wortel- gew./plant (g)	Aantal R.s./ 10 g wortels	Bestrijdings- effect (%) <sup>1)</sup>
Onbesmet	--	-	-	90	0	100
55 / 30	10.280	0	0	89	0	100
55 / 10	11.050	0	0	88	0	100
50 / 30	10.735	3	0	90	740	77
50 / 10	10.710	90	32	70	3.442	-5
45 / 30	11.550	94	34	54	3.520	-7
45 / 10	10.215	98	47	60	3.364	-3
40 / 30	11.450	98	74	65	3.269	0
40 / 10	11.560	98	79	58	3.246	1
Controle	10.020	98	80	60	3.279	--

<sup>1)</sup> Bestrijdingseffect (%) = 100(1-R.S.controle/R.S.behandeling)

Uit Tabel 1 blijkt dat wanneer *R. similis* in de voedingsoplossing gedurende 10 en 30 seconden wordt blootgesteld aan een temperatuur van 55°C alle aaltjes direct zijn gedood, waardoor geen aantasting is ontstaan. Tevens laten de resultaten zien dat wel aantasting kan ontstaan wanneer er binnen één dag na het behandelen geen spontaan bewegende aaltjes worden aangetroffen. Dat was het geval bij de behandeling van 50°C en 30 seconden. Uit latere proeven zou blijken dat dit komt doordat een aantal

van de niet gedode aaltjes zich na verloop van tijd weer weet te herstellen, dat wil zeggen weer spontaan bewegend worden.

De kolom met de verse wortelgewichten laat zien dat *R. similis* erg schadelijk kan zijn voor *Anthurium andreaeanum*. De aantastingen in de behandeling van 50°C en 10 seconden en bij lagere temperaturen waren even hoog als in de controle-behandeling en resulteerden ten opzichte van 'Onbesmet' in 22 tot 36% lagere verse wortelgewichten.

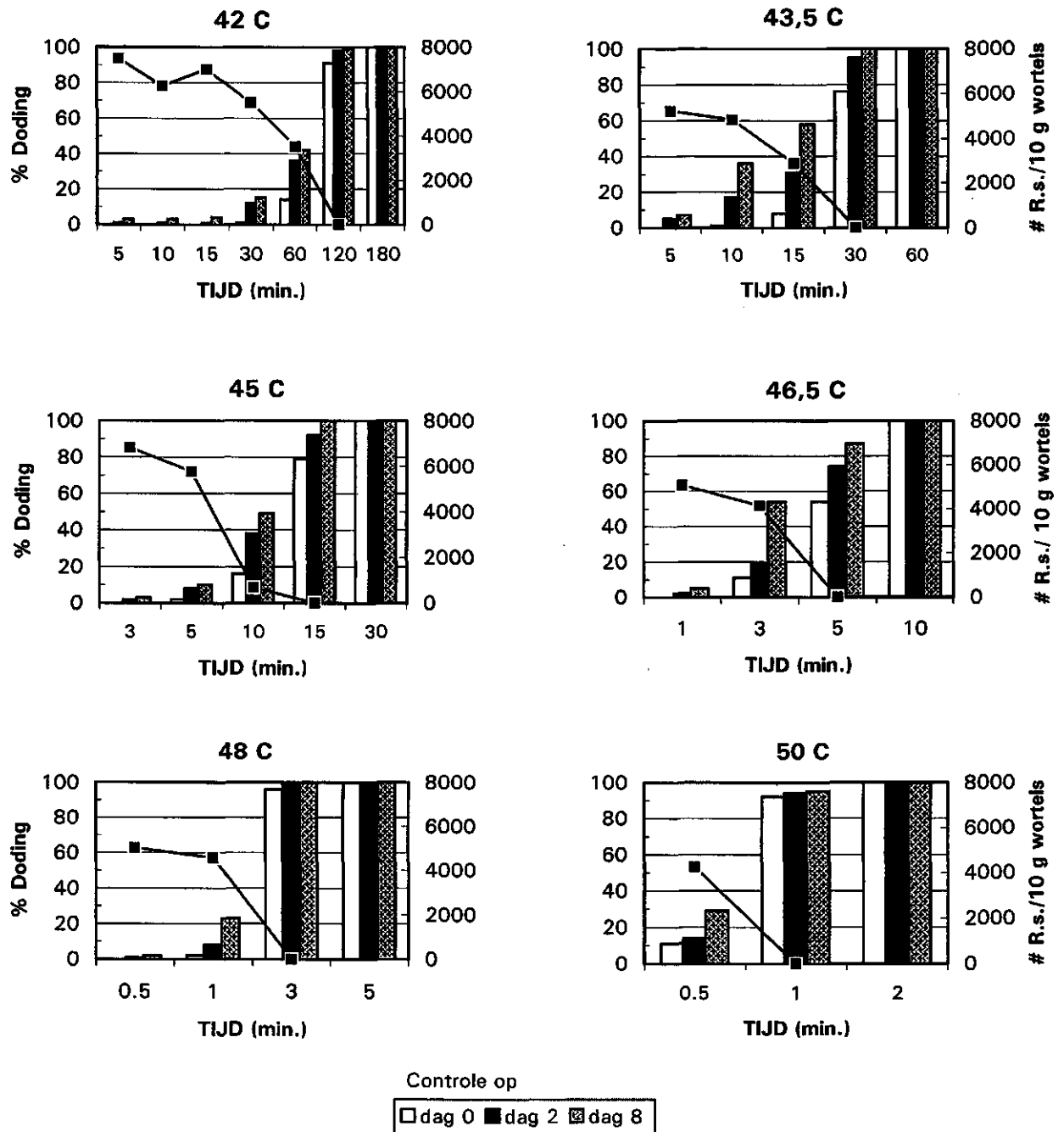
Samenvattend kan worden gesteld dat bij behandeltijden van 10 en 30 seconden de voedingsoplossing tenminste tot een temperatuur van 55°C moet worden verwarmd om het wortelnecrose-aaltje *R. similis* onschadelijk te maken. Of een lagere temperatuur ook nog afdoende is, zal blijken uit de resultaten hieronder.

#### *Lage temperaturen: 42 tot 55°C*

##### • Proef 1: in vitro en in vivo

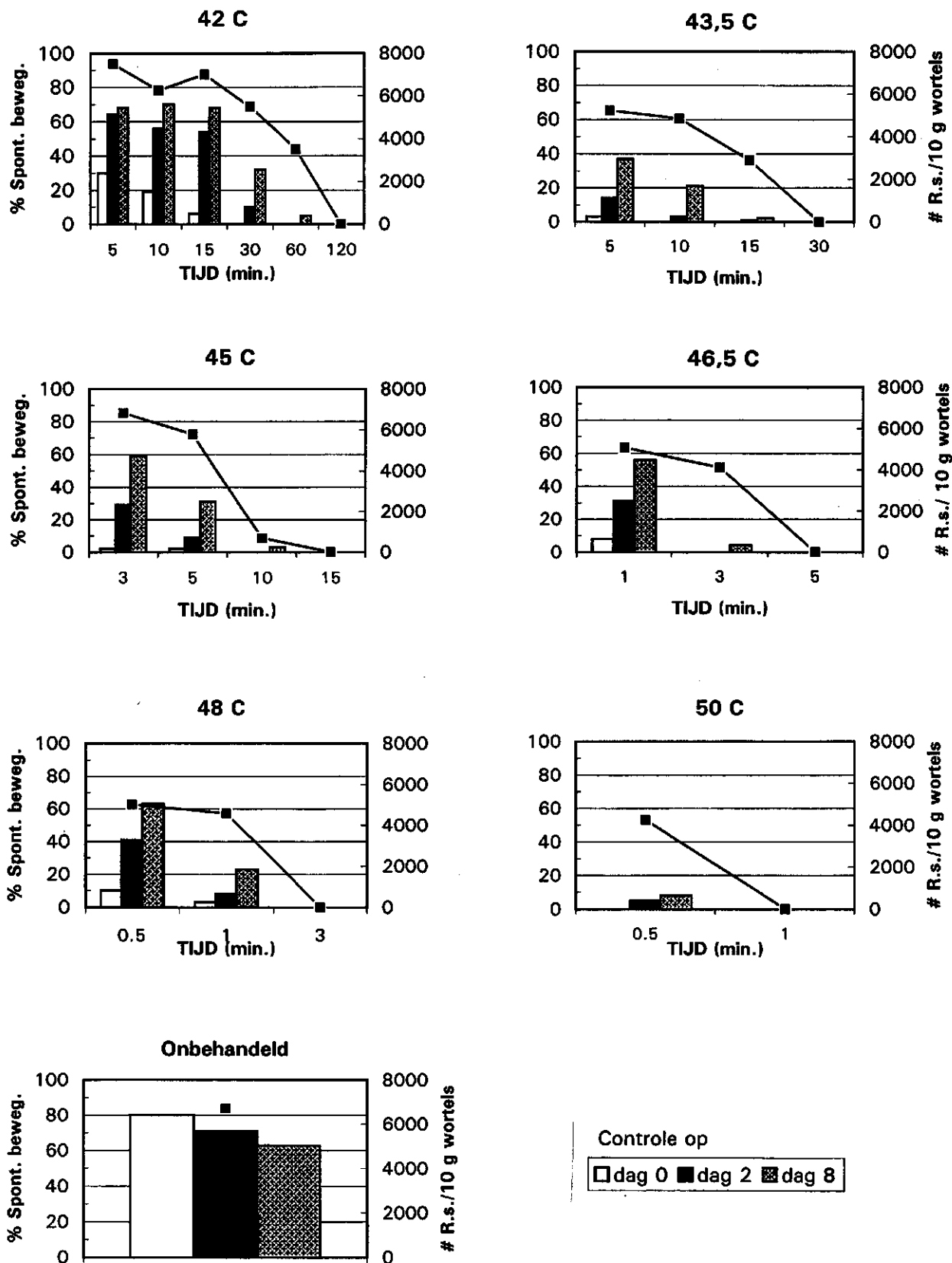
De proef is uitgevoerd met een *R. similis*-suspensie die 2% dode aaltjes bevatte, 18% aaltjes die alleen na aanraking bewogen en 80% spontaan bewegende aaltjes. De suspensie bestond voor 79% uit volwassen aaltjes en voor 21% uit larven. De proef is uitgevoerd bij temperaturen van 42 tot 55°C. Hierbij zijn verschillende behandeltijden getest, beginnend bij 30 seconden bij 55°C en eindigend bij 180 minuten bij 42°C. Figuur 1 laat zien welke tijd/temperatuurcombinaties zijn getest. Hierin zijn, evenals in Figuur 2, de temperaturen van 52,5 en 55°C weggelaten, omdat ook bij de kortste behandeltijd van 30 seconden alle aaltjes waren gedood en er geen aantasting ontstond. De kolomdiagrammen geven voor dag 0, 2 en 8 na het behandelen aan welk percentage aaltjes ten opzichte van 'Onbehandeld' is gedood. Het dodingspercentage is berekend volgens formule 1 (zie hoofdstuk 2). De kolomdiagrammen in Figuur 2 geven voor de drie beoordelingstijdstippen aan welk gedeelte van de aaltjessuspensies bestond uit spontaan bewegende aaltjes. De lijngrafiek in beide figuren laten zien hoeveel *R. similis* er veertien weken na het inoculeren in 10 g wortels aanwezig waren (rechter y-as). Uit Figuur 1 blijkt dat het percentage gedode aaltjes toeneemt bij toenemende temperaturen en behandeltijden. De dodingspercentages nemen ook toe bij de drie opeenvolgende controles (dag 0, 2 en 8). Zijn op dag 0 niet alle aaltjes gedood, dan hoeft dit niet te betekenen dat er dan aantasting ontstaat. Aantasting ontstaat alleen wanneer er spontaan bewegende aaltjes zijn (Figuur 2). Uit Figuur 2 blijkt echter ook dat aaltjes zich kunnen herstellen van een warmwaterbehandeling. Dit houdt in dat wanneer er op dag 0 geen spontaan bewegende aaltjes worden aangetroffen deze enkele dagen later wel aanwezig kunnen, waardoor er toch aantasting kan ontstaan. Voor een juiste beoordeling van de warmwaterbehandeling kan dus niet worden volstaan met alleen een controle op dag 0. Herstel is uiteraard niet mogelijk voor de aaltjes die zijn gedood, maar uitsluitend voor aaltjes die alleen na aanraking nog tot bewegen in staat zijn. In het onderzoek dat is beschreven onder '*Korte behandeltijden: 10 en 30 seconden*' hebben de aaltjes die gedurende 30 seconden zijn blootgesteld aan 50°C geresulteerd in een aantasting hoewel er één dag na het behandelen geen spontaan bewegende aaltjes waren. Uit Figuur 2 wordt duidelijk waarom dit het geval is geweest. Bij de behandeling waren op dag 0 weliswaar geen spontaan bewegende aaltjes aanwezig, maar wel bij de controles op dag 2 en 8. Ook nu veroorzaakte deze behandeling weer aantasting. Aantasting ontstond ook bij diverse andere behandelingen, waarbij er op dag 0 en/of dag 2 geen spontaan bewegende aaltjes aanwezig waren, maar wel op dag 8. Het herstel treedt dus tenminste op over een periode van acht dagen. Voor een juiste beoordeling van het behandelingseffect is dit een belangrijk gegeven. Dit is met name van belang

# DODING *R. similis* t.o.v. 'Onbehandeld' & AANTASTING



**Figuur 1** - Effect van verhitting van voedingsoplossing op de doding van *R. similis* (kolom-diagrammen), gecontroleerd op dag 0, 2 en 8 na het behandelen en op de mate van aantasting van *Anthurium andreaeanum* veertien weken na het inoculeren (lijngrafiek)

## SPONTAAN BEWEGENDE *R. similis* & AANTASTING



Figuur 2 - Effect van verhitting van voedingsoplossing op het spontaan bewegend vermogen van *R. similis* (staafdiagrammen) tot acht dagen na het behandelen en op de mate van aantasting van Anthurium (lijngrafiek)

wanneer er geen inoculaties worden uitgevoerd. In dat geval moeten de aaltjessuspensies minstens tot acht dagen na het behandelen worden gecontroleerd op de aanwezigheid van spontaan bewegende aaltjes.

- Proef 2: in vitro

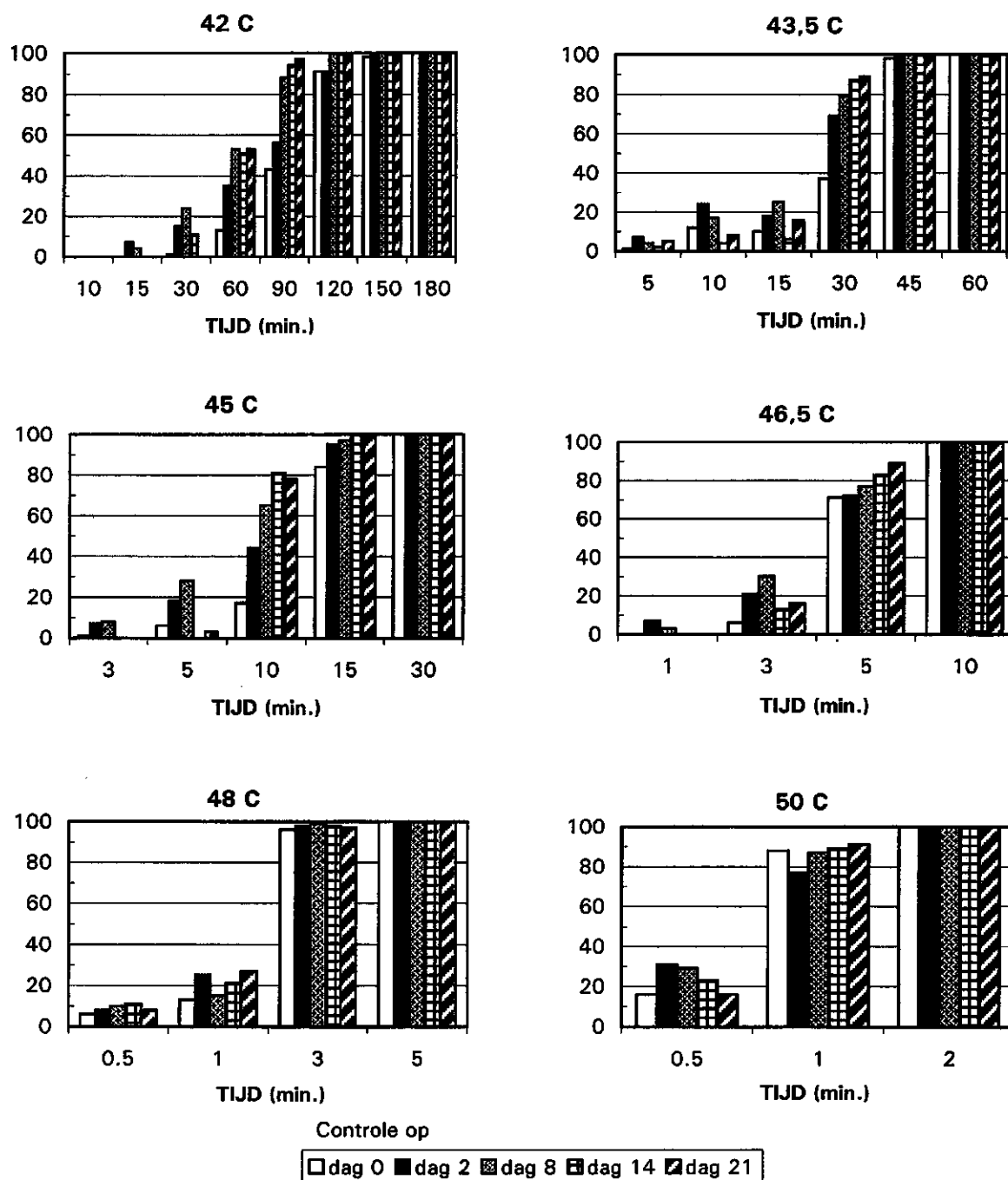
De proef is uitgevoerd met een *R. similis*-suspensie, die 2% dode aaltjes bevatte, 5% aaltjes die alleen na aanraking bewogen en 93% spontaan bewegende aaltjes. De suspensie bestond voor 52% uit volwassen aaltjes en voor 48% uit larven. Ook nu zijn weer temperaturen getest tussen 42 en 55°C. Figuur 3 laat zien welke behandel tijden zijn gebruikt en geeft aan welke percentages aaltjes ten opzichte van 'Onbehandeld' zijn gedood. Met de behandelde aaltjes zijn geen inoculaties uitgevoerd. Daarentegen zijn de controles langer voortgezet om na te gaan tot hoelang herstel optreedt. De aaltjes zijn op de dagen 0, 2, 8, 14 en 21 na het behandelen gecontroleerd op hun bewegend vermogen. Figuur 4 toont het verloop van de percentages spontaan bewegende aaltjes. Hoewel het herstel zich vooral in de eerste twee dagen voordeed, werd soms het herstel pas na twee weken zichtbaar. Dit was het geval bij de behandeling van 50°C en 1 minuut. Het percentage spontaan bewegende aaltjes nam meestal na acht dagen weer af. Evenals in de vorige proef zijn ook nu de resultaten van de behandelingen bij 52,5 en 55°C niet in de figuren opgenomen, omdat ook bij de kortste behandel tijd van 30 seconden alle aaltjes direct waren gedood.

In vergelijking met de vorige proef waren bij vier temperaturen langere behandel tijden nodig om geen spontaan bewegende aaltjes aan te treffen. De reden daarvoor kan mogelijk zijn dat de aaltjessuspensie, die voor het ontsmetten is gebruikt nu relatief meer spontaan bewegende aaltjes bevatte dan in de vorige proef, namelijk 93% tegenover 80%. Mogelijk was de aaltjespopulatie nu vitaler.

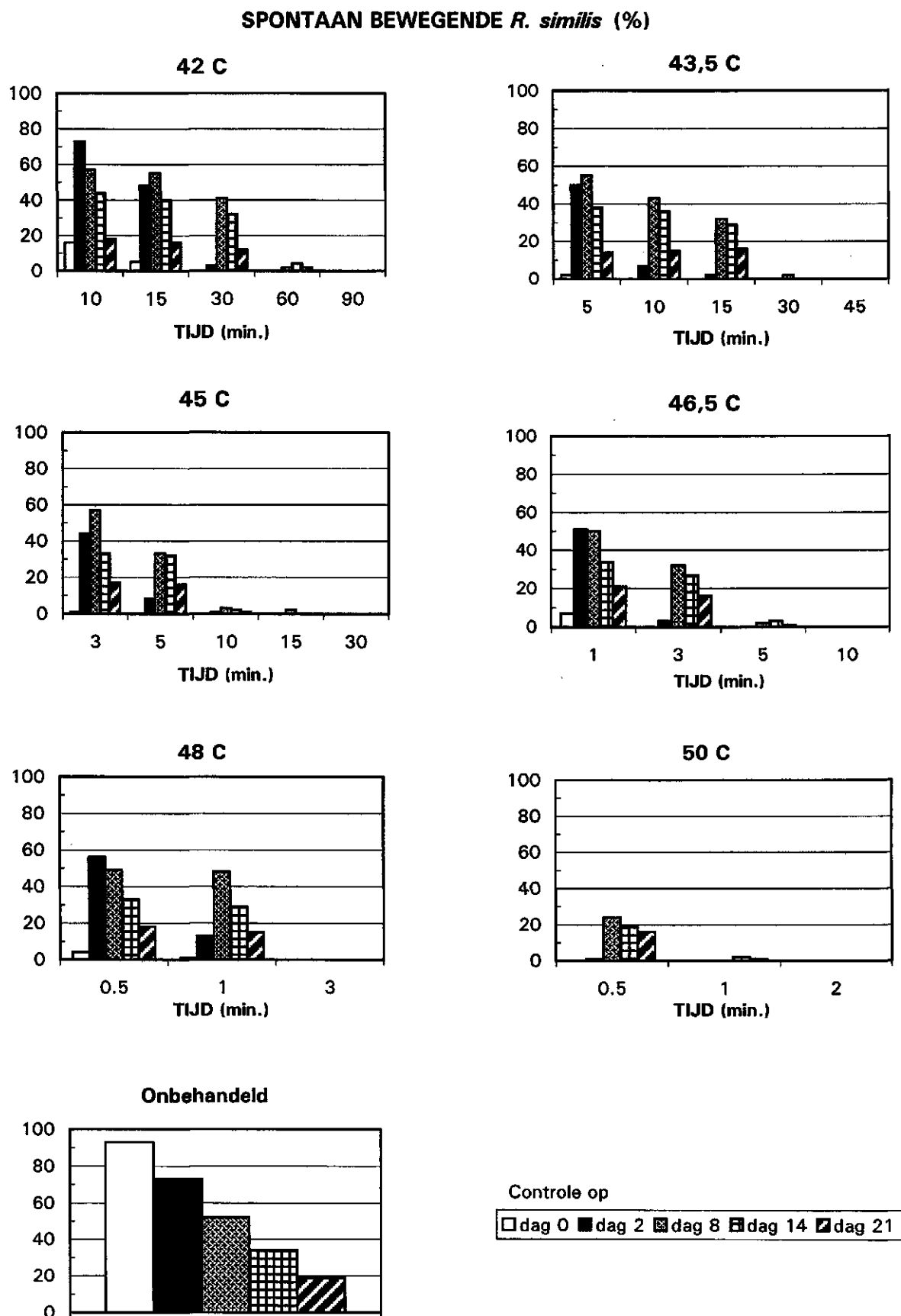
Voor beide proeven is in Tabel 2 aangegeven welke behandel tijden er minimaal nodig waren om op dag 0 een doding van 100% te verkrijgen en om op geen van de dagen, waarop is gecontroleerd, spontaan bewegende aaltjes te vinden. In beide gevallen ontstaat dan geen aantasting. Uit deze tabel blijkt dat in beide proeven dezelfde behandel tijden nodig waren om op dag 0 tot een 100% doding te komen. In tegenstelling hiermee waren in beide proeven wel de behandel tijden verschillend om het spontaan bewegend vermogen geheel verloren te laten gaan. Meestal was voor een 100% doding een langere behandel tijd nodig dan voor het uitschakelen van het spontaan bewegend vermogen. Afwezigheid van spontaan bewegende aaltjes is een minimale voorwaarde om aantasting te voorkomen. Om na te gaan of aan dit criterium is voldaan, moeten de aaltjes tenminste tot veertien dagen na het behandelen worden gecontroleerd.

Voor een 100% doding van juvenielen en volwassen *R. similis* waren bij temperaturen van 42, 43,5, 45, 46,5, 48, 50 en 52,5°C respectievelijk 180, 60, 30, 10, 5, 2 en 0,5 minuten nodig. Qiu et al (1993a) vonden dat voor 100% doding van het stengelaaltje *Ditylenchus dipsaci* bij temperaturen van 44, 46, 48 en 50°C respectievelijk 150, 60, 15 en 15 minuten nodig waren. *D. dipsaci* is dus moeilijker te doden dan *R. similis*. Daarentegen is het aardbeibladaaltje *Aphelenchoides fragariae* gemakkelijker te doden (Qiu et al, 1993b). Voor een 100% doding van *A. fragariae* in water waren bij temperaturen van 44,4, 46,1, 47,7 en 49,4°C respectievelijk 15, 5, 4 en 2 minuten nodig

**DODING *R. similis* t.o.v. 'ONBEHANDELD' (%)**



**Figuur 3 -** Effect van verhitting van voedingsoplossing op de doding van *R. similis* tot 21 dagen na het behandelen



**Figuur 4 -** Effect van verhitting van voedingsoplossing op het spontaan bewegend vermogen van *R. similis* tot 21 dagen na het behandelen

**Tabel 2 - Relatie tussen verhitting van voedingsoplossing en de behandel tijd resulterend in A) 100% doding en B) 0% spontaan bewegende *R. similis***

Temperatuur (°C)	42	43,5	45	46,5	48	50	52,5
<b>A. 100% doding</b>	<b>Behandeltijd (minuten)</b>						
Proef 1	180	60	30	10	5	2	0,5
Proef 2	180	60	30	10	5	2	0,5
<b>B. 0% spontaan bewegend</b>							
Proef 1	120	30	15	5	3	1	0,5
Proef 2	90	45	30	10	3	2	0,5

### 3.3 CONCLUSIES

Uit het onderzoek naar ontsmetting van voedingsoplossing tegen het wortelnecrose-aaltje *R. similis* met behulp van verhitting in een warmwaterbak kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

***R. similis* in voedingsoplossing is erg gevoelig voor verhitting, maar de aaltjes kunnen zich herstellen.**

- Een behandeling is 100% effectief wanneer er geen spontaan bewegende aaltjes meer zijn.
- Wanneer direct na het behandelen geen 100% doding is bereikt, kan het spontaan bewegend vermogen zich gedurende de eerste twee weken herstellen.
- Bij een behandel tijd van 30 seconden is een temperatuur van 52,5°C voldoende om alle aaltjes te doden.
- Bij een behandel tijd van 5 minuten moet voor een 100% doding een temperatuur worden gerealiseerd die ligt tussen 47 en 48°C.



## 4. UV-STRALING

Waterontsmetting door middel van UV-bestraling is al tenminste 20 jaar een beproefde methodiek om pathogenen onschadelijk te maken. Ultra-violet (UV) licht heeft een golflengte van 100 tot 400 nm. Binnen dit gebied hebben UV-stralen van 200 tot 280 nm een kiemdodende werking met een optimum bij 254 nm (Gelzhäuser et al., 1985). Deze stralen, de zogenaamde UV-C stralen, beschadigen het celmateriaal door middel van een fotochemische reactie zodanig dat de ziektekiemen niet meer kunnen functioneren. De stralingsdosis, die nodig is om het te behandelen water voldoende te ontsmetten, is het product van de stralingsintensiteit van de lampen en de contacttijd met de ziektekiemen. De dosis wordt uitgedrukt in mJ per cm<sup>2</sup> (J = Joule). De contacttijd van de straling met de kiemen is afhankelijk van de doorstroomsnelheid en de transmissiewaarde van het water. De transmissiewaarde wordt uitgedrukt in procenten en geeft aan welk deel van de UV-stralen van 254 nm door een waterlaag van 10 mm wordt doorgelaten. UV wordt opgewekt in kwikdamplampen. Er zijn twee typen lampen: de hoge- en de lagedruk kwikdamplamp. Het rendement van een hogedruk lamp ten opzichte van het aansluitvermogen is vrij laag (circa 10%) in vergelijking met een lagedruk lamp (circa 40%). Een lagedruk lamp werkt specifiek in het gebied van 250-260 nm, terwijl een hogedruk lamp in het hele UV-C gebied van 200-280 nm werkt (Runia, 1992).

Op het proefstation is door Runia veel onderzoek gedaan naar de ontsmettende werking van beide typen UV-lampen. Voor een algehele ontsmetting van voedingsoplossing tegen schimmels, bacteriën en virussen is een UV-dosis van 250 mJ/cm<sup>2</sup> nodig. En voor een selectieve ontsmetting tegen schimmels en bacteriën wordt een dosis van 100 mJ/cm<sup>2</sup> geadviseerd (Runia, 1992). Deze adviezen gelden voor beide typen lampen. Diverse buitenlandse onderzoekers hebben het effect van UV onderzocht tegen aaltjes, zoals de vrijlevende aaltjes *Caenorhabditis elegans* (Klass, 1977 en Hartman, 1984) en *Rhabditidae tokai* (Ishii and Suzuki, 1979). Moens en Hendrickx (1989) hebben de gevoeligheid van het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita* voor UV-stralen onderzocht. Vanaf 1992 tot 1995 is op het PBG onderzoek gedaan naar de ontsmettende werking van UV tegen het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis*.

Het doel van dit onderzoek is nagaan in hoeverre lagedruk UV-straling geschikt is om wortelaaltjes in voedingsoplossing onschadelijk te maken.

### 4.1 MATERIALEN EN METHODEN

#### *UV-installatie*

Het onderzoek naar de ontsmettende werking van UV-straling tegen *R. similis* is uitgevoerd met een commerciële testinstallatie van Wedeco B.V. op PBG-locatie Naaldwijk. De installatie bevatte een zandfilter met een zandfractie van 0,4 tot 0,8 mm om alle vaste stoffen uit het water te filteren alvorens het water aan UV-licht bloot te stellen. Ten behoeve van het onderzoek werd het zandfilter verwijderd omdat uit een oriënterende proef bleek dat bijna 90% van de aaltjes in het zandfilter achterbleef. De UV-installatie bestond uit een kwartsbuis met een diameter van 70 mm waardoor het water stroomde. De buis was omgeven door vier lagedruk 100 Watt-kwikdamplampen, die elk 40 Watt UV-C stralen produceerden. De stralen hadden voornamelijk een golflengte van 253,7 nm. De UV-dosis wordt berekend door de stralingintensiteit in mW/cm<sup>2</sup> te vermenigvuldigen met de tijd in seconden (s) gedurende welke de aaltjes aan de UV-stralen worden blootgesteld. Dit resultaat wordt uitgedrukt in mJ/cm<sup>2</sup> (= mW.s/cm<sup>2</sup>). De stralingsintensiteit in het water is afhankelijk van de energie, die de lampen uitstralen en

van de transmissiewaarde (T). De transmissiewaarde geeft aan welk percentage van de UV-stralen met een golflengte van 254 nm een waterlaag van 10 mm passeert. In de proeven zijn deze waarden bepaald nadat de aaltjes aan het te ontsmetten water waren toegevoegd. Alleen bij  $T \geq 50\%$  worden de gemiddelde UV-doses door de fabrikant van de UV-installatie gegarandeerd. Bij lagere transmissiewaarden zijn gemiddelde UV-doses niet goed te berekenen omdat de gerealiseerde doses op de verschillende plaatsen in de 70-mm waterlaag te ver uit elkaar liggen. Dit is dan ook de reden waarom in de proeven met  $T < 50\%$  geen UV-doses zijn vermeld.

### **Proeven**

Het onderzoek is uitgevoerd bij stroomsnelheden van 500, 1000, 2500 en 5000 liter per uur. Bij  $T \geq 50\%$  correspondeerden deze stroomsnelheden met UV-doses van respectievelijk 500, 250, 100 en 50 mJ/cm<sup>2</sup>. De aaltjes werden na menging vanuit een voorraadtank met 500 liter drainwater, afkomstig van tomaat, rechtstreeks door de UV-installatie gepompt. Het drainwater werd kunstmatig besmet met 1000 tot 1300 *R. similis* per liter. Nadat het besmette drainwater was behandeld, zijn in de proeven 1 t/m 4 monsters van 8 tot 10 liter opgevangen en in proef 5 monsters van 50 liter water. De aaltjes zijn uit de drainwatermonsters gehaald door de monsters over een 25 µm-zeef uit te gieten, waarna de aaltjes met behulp van ongeveer 400 ml water van de zeef zijn gespoeld. De volgende dag zijn de aantallen *R. similis* in de monsters geteld en is het bewegend vermogen bepaald. Het dodingspercentage als gevolg van de UV-bestraling is berekend met formule 1 (zie hoofdstuk 2).

Met de behandelde en onbehandelde aaltjes zijn planten *Anthurium andreanum* cv. Acropolis geïnoculeerd om vast te stellen in hoeverre de aaltjes nog tot aantasting en vermeerdering in staat waren. Per plant zijn ongeveer 3000 *R. similis* geïnoculeerd. In de proeven 1 t/m 4 zijn drie planten per behandeling geïnoculeerd. In proef 5 is een behandeling uitgevoerd waarbij achttien planten zijn geïnoculeerd. Met uitzondering van proef 5 zijn de planten veertien tot zestien weken na het inoculeren bemonsterd om de hoogte van de aantasting in de wortels vast te stellen. In proef 5 zijn de bemonsteringen op verschillende tijdstippen na het inoculeren uitgevoerd.

#### **• Proef 1**

In de eerste proef is drainwater vermengd met omgekeerde osmose-water, waardoor de transmissiewaarde T op 54% uitkwam. Bij deze transmissiewaarde leverden de stroomsnelheden van 500, 1000, 2500 en 5000 liter/uur effectieve UV-doses op van respectievelijk 500, 250, 100 en 50 mJ/cm<sup>2</sup>. Onbehandeld is verkregen door het besmette drainwater met een snelheid van 1000 liter/uur langs de uitgeschakelde lampen te laten stromen. Er is ook een onbehandelde controle direct uit de tank genomen.

#### **• Proef 2**

In proef 2 is onvermengd drainwater gebruikt met een transmissiewaarde van 37%. De gebruikte stroomsnelheden waren 500, 1000, 2500 en 5000 liter/uur. Er zijn twee onbehandelde controles in de proef opgenomen. De eerste onbehandelde controle is rechtstreeks uit de tank genomen, terwijl de tweede onbehandelde controle is verkregen door het besmette drainwater met een snelheid van 5000 liter/uur langs de uitgeschakelde lampen te laten stromen.

- **Proef 3**

In proef 3 is drainwater getest met een transmissiewaarde van 16%. Daarvoor is Fongarid 25 WP aan het drainwater toegevoegd in een hoeveelheid van 0,04 g/liter (concentratie: 0,004%). Ook nu zijn weer twee onbehandelde controles in de proef opgenomen en wel op dezelfde wijze als in proef 2.

- **Proef 4**

In proef 4 zijn verschillende hoeveelheden Fongarid 25 WP aan het drainwater toegevoegd om vast te kunnen stellen bij welke transmissiewaarden er geen vermeerdering van aaltjes meer plaatsvindt. De volgende concentraties Fongarid 25 WP zijn gebruikt: 0%, 0,002%, 0,004% en 0,008%. Dit leverde transmissiewaarden op van respectievelijk 33%, 18%, 10% en 3%. Er is gewerkt met een stroomsnelheid van 2500 liter/uur. In de proef waren weer twee controle-behandelingen opgenomen: één uit de tank zonder Fongarid 25 WP en één uit de UV-installatie waarbij het drainwater, waaraan 0,008% Fongarid 25 WP was toegevoegd, met een snelheid van 2500 liter/uur langs de uitgeschakelde lampen is geleid.

- **Proef 5**

Hoewel er bij de lage transmissiewaarden in de proeven 1 t/m 4 wel spontaan bewegende aaltjes aanwezig waren, werden er veertien tot zestien weken na het inoculeren geen *R. similis* in de wortels aangetroffen. Om na te gaan of de nog spontaan bewegende aaltjes wel tot aantasting komen, maar niet meer tot vermeerdering in staat zijn, is proef 5 uitgevoerd. In deze proef is 0,002% Fongarid 25 WP aan het drainwater toegevoegd. Dit resulteerde in een T van 15,0%. De stroomsnelheid bedroeg 2500 liter per uur. Bij de onbehandelde controle is dezelfde stroomsnelheid toegepast, maar waren de lampen uit. Zowel bij de behandeling met de UV-bestraalde aaltjes als bij de onbehandelde controle zijn na telling en vaststelling van het bewegend vermogen achttien planten geïnoculeerd. Op elk van de tijdstippen 1, 2, 4, 8, 12 en 16 weken na het inoculeren zijn drie planten bemonsterd om het infectie- en vermeerderingsvermogen van *R. similis* vast te kunnen stellen.

## **4.2 RESULTATEN EN DISCUSSIE**

- **Proef 1 t/m 3**

De resultaten van de proeven 1 t/m 3 zijn opgenomen in Tabel 3 en Figuur 5. Deze tabel geeft informatie over de doding en het spontaan bewegend vermogen van *R. similis* een dag na het behandelen. Tussen haakjes is aangegeven hoeveel weken het duurde voordat alle aaltjes dood waren en er geen spontaan bewegende aaltjes meer in de monsters aanwezig waren. Ook is in Tabel 3 opgenomen hoeveel aaltjes er veertien tot zestien weken na het inoculeren van planten van *Anthurium andreaeanum* cv. Acropolis, in de wortels zijn aangetroffen. De resultaten van de twee onbehandelde controles verschilden niet. Daarom is in de tabel slechts één 'Onbehandeld' opgenomen, namelijk de onbehandelde controle genomen uit het UV-apparaat met uitgeschakelde lampen. Figuur 5 is een grafische weergave van de doding van *R. similis* in relatie tot de transmissiewaarde en de stroomsnelheid.

Uit Tabel 3 en Figuur 5 blijkt dat de doding toeneemt naarmate de stroomsnelheid afneemt en de transmissiewaarde hoger is. In beide gevallen neemt de UV-dosis toe. Hogere UV-doses hebben dus hogere dodingspercentages tot gevolg. Het hoogste dodingseffect was 96% en werd verkregen bij een stroomsnelheid van 500 liter/uur en een transmissiewaarde van 54%. In dat geval bedroeg de UV-dosis 500 mJ/cm<sup>2</sup>. Bij de

transmissiewaarde van 37% was het dodingseffect aanzienlijk geringer. Het duurde minimaal twee weken voordat alle aaltjes dood waren. Bij 'Onbehandeld' was de levensduur acht weken. De behandelingen bij de transmissiewaarde van 16% hadden nauwelijks of geen doding tot gevolg en hadden bovendien geen invloed op de levensduur. In tegenstelling tot dit onderzoek verkregen Moens en Hendrickx (1989) al een 100% doding bij UV-doses  $\geq 200$  mJ/cm<sup>2</sup>. Daarbij moet echter worden vermeld dat deze onderzoekers juvenielen in het tweede larvale stadium van het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita* aan UV-stralen hebben blootgesteld, terwijl in de hier beschreven proeven ook volwassen aaltjes zijn gebruikt. Waarschijnlijk zijn volwassen aaltjes minder gevoelig voor UV-stralen dan juvenielen. Dat het effect van UV-stralen beïnvloed wordt door de leeftijd van de aaltjes wordt bevestigd door andere onderzoekers. Klass (1977) en Hartman (1984) stelden vast dat de UV-gevoeligheid van het aaltje *Caenorhabditis elegans* afneemt naarmate de leeftijd toeneemt. Gelijkoortige resultaten werden waargenomen bij *Rhabditidae tokai* (Ishii and Suzuki, 1979). Zij zagen dat eitjes gevoeliger zijn dan larven.

**Tabel 3 -** Effect van UV-bestraling op het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* in drainwater en op de aantasting van *Anthurium andreanum* in relatie tot de transmissiewaarde (T) en de stroomsnelheid (proef 1-3).

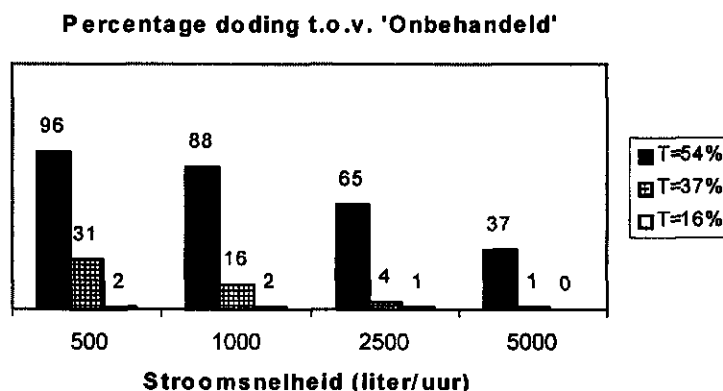
Stroomsnelheid (l/uur)	Doding (%) <sup>a</sup> / Spontaan bewegend (%) (1 dag na behandeling)			Aantal <i>R. similis</i> /10 g wortels (14-16 weken na inoculatie)		
	Proef: 1 T: 54%	2 37%	3 16%	Proef: 1 T: 54%	2 37%	3 16%
500	96 / - <sup>d</sup>	31 (2) <sup>b</sup> / 5 (1) <sup>c</sup>	2 (11) <sup>b</sup> / 33 (5) <sup>c</sup>	0	0	0
1000	88 / -	16 (3) / 14 (1)	2 (11) / 45 (5)	0	0	0
2500	65 / -	4 (5) / 25 (1)	1 (13) / 47 (8)	0	0	0
5000	37 / -	1 (7) / 36 (3)	0 (12) / 46 (7)	0	0	0
Onbehandeld	0 / -	0 (8) / 70 (7)	0 (11) / 70 (7)	1160	623	600

<sup>a</sup> Percentage gedode *R. similis* ten opzichte van 'Onbehandeld'.

<sup>b</sup> Tussen haakjes: aantal weken waarna alle aaltjes dood waren.

<sup>c</sup> Tussen haakjes: aantal weken waarna er geen spontaan bewegende aaltjes meer aanwezig waren.

<sup>d</sup> Percentage spontaan bewegend is niet apart bepaald.



**Figuur 5 -** Doding van *Radopholus similis* als gevolg van UV-bestraling in relatie tot de transmissiewaarde (T) en de stroomsnelheid

Bij afnemende dodingspercentages nam het spontaan bewegend vermogen toe (Tabel 3). Bij de transmissiewaarde van 37% in proef 2 daalde het aantal spontaan bewegende aaltjes van 70% bij 'Onbehandeld' naar 5% bij de laagste stroomsnelheid. In proef 2 waren bij de drie laagste stroomsnelheden één week na het behandelen geen spontaan bewegende aaltjes meer aanwezig. Bij 'Onbehandeld' duurde dat zeven weken. Bij de transmissiewaarde van 16% was het effect op de spontaan bewegende aaltjes aanzienlijk geringer. De levensduur van deze aaltjes werd er nauwelijks door beïnvloed. Niettemin waren ook de UV-bestraalde aaltjes in proef 3 niet in staat aantasting te veroorzaken. Dit betekent dat de UV-bestraalde aaltjes toch een verandering hebben ondergaan. Bij 'Onbehandeld' varieerde de aantasting van 600 tot 1160 *R. similis* per 10 g wortels.

Wat betreft het spontaan bewegend vermogen van *R. similis*, in een tijdsbestek van zeven tot acht weken nam dit af van 70% tot 0%. Dit komt overeen met de bevindingen van Birchfield (1957). Zowel in water-agar als in steriel water vond hij na 52 dagen nog slechts een enkele spontaan bewegende *R. similis*, maar na 66 dagen waren alle aaltjes ogenschijnlijk dood.

#### • Proef 4

Deze proef is uitgevoerd om na te gaan bij welke transmissiewaarde de UV-bestraalde aaltjes nog wel tot aantasting zouden komen. Er is een constante stroomsnelheid van 2500 liter drainwater/uur gebruikt met een transmissiewaarde van tenminste 50%. Dit leverde een UV-dosis op van 100 mJ/cm<sup>2</sup>. Deze dosis wordt geadviseerd voor het doden van schimmels en bacteriën. In deze proef zijn de volgende transmissiewaarden getest: 3, 10, 18 en 30%, zodat de UV-doses lager waren dan 100 mJ/cm<sup>2</sup> (Tabel 4). Uit Tabel 4 blijkt dat het effect op de doding en het spontaan bewegend vermogen overeenkwamen met de resultaten van de proeven 1 t/m 3 in Tabel 3. Alleen bij T=30% was er sprake van enige doding (5%) één dag na het behandelen. Het spontaan bewegend vermogen was bij alle UV-behandelingen lager ten opzichte van 'Onbehandeld' en varieerde van 13 tot 26% tegenover 34% bij Onbehandeld. Alleen bij een transmissiewaarde van 3% ontstond aantasting. Maar met 903 *R. similis* per 10 g wortels was de aantasting betrouwbaar lager dan de aantasting van 4867 *R. similis* per 10 g wortels bij 'Onbehandeld'. Bij de transmissiewaarde van 10%, die in combinatie met een stroomsnelheid van 2500 liter/uur een geschatte UV-dosis oplevert van ongeveer 10 mJ/cm<sup>2</sup>, bleef vermeerdering uit. Hiermee is aangetoond dat het vermeerderingsvermogen van *R. similis* uitermate gevoelig is voor UV-straling, terwijl het odingseffect veel geringer is. Wat betreft de vermeerdering van het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita* hebben Moens en Hendrickx (1989) vastgesteld dat een UV-dosis van 14 mJ/cm<sup>2</sup> voldoende is om vermeerdering te voorkomen. Deze dosis komt nagenoeg overeen met de geschatte UV-dosis van 10 mJ/cm<sup>2</sup> waarbij *R. similis* zich in onze proeven niet meer vermeerderde.

**Tabel 4 -** Effect van UV-bestraling op het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* in drainwater en op de aantasting van *Anthurium andreaeanum* in relatie tot de transmissiewaarde (T) bij een constante stroomsnelheid van 2500 liter/uur

	T: 30%	18%	10%	3%	Onbehandeld
<b>Doding (%)<sup>a</sup> / Spontaan bewegend (%)</b>					
(1 dag na behandeling)	5 / 13	1 / 22	0 / 24	0 / 26	0 / 34
<b>Aantal <i>R. similis</i>/10 g wortels</b>					
(16 weken na inoculatie)	0	0	0	903	4867

<sup>a</sup> zie onder Tabel 3.

• **Proef 5**

Afwezigheid van vermeerdering hoeft niet te betekenen dat de met UV-stralen behandelde aaltjes niet tot aantasting in staat zijn. Uit onderzoek met andere ontsmettingsmethodieken is steeds gebleken dat spontaan bewegende aaltjes nodig zijn om aantasting te veroorzaken. Uit de tabellen 3 en 4 blijkt dat er na een UV-behandeling nog voldoende spontaan bewegende aaltjes resteren. Bovendien kan het lang duren voordat er geen spontaan bewegende aaltjes meer zijn (Tabel 3). De kans is dus aanwezig dat de behandelde aaltjes nog wel tot aantasting komen. Maar omdat er geen aaltjes in de wortels van de anthuriums worden gevonden, betekent dit dat ze zich niet vermeerderen. In dat geval zijn de aaltjes steriel geworden. In proef 5 is dit aspect onderzocht door de geïnoculeerde anthuriums op verschillende tijdstippen te onderzoeken op aaltjes. De aaltjes zijn aan UV-stralen blootgesteld bij een transmissiewaarde van 15% en een stroomsnelheid van 2500 liter/uur.

Uit Tabel 5 blijkt dat de doding nihil is geweest. Ten opzichte van 'Onbehandeld' is slechts 2% direct gedood. Het percentage spontaan bewegende *R. similis* was teruggelopen van 33% in 'Onbehandeld' tot 14% in de UV-behandeling. Uit de tabel blijkt dat de aaltjes wel planten hebben aangetast, maar niet tot vermeerdering zijn gekomen. De aaltjes die tot aantasting kwamen, stierven zonder nakomelingen te hebben nagelaten. Zestien weken na het inoculeren werden geen *R. similis* meer in de wortels van de UV-behandeling gevonden. Dat er geen vermeerdering heeft plaatsgevonden, is goed te zien aan het feit dat het aandeel larven geleidelijk aan kleiner werd. Na een week behoorde 17% van de gevonden aaltjes tot het larvale stadium, terwijl na acht weken geen larven meer aanwezig waren. In tegenstelling hiermee werd het aandeel larven bij 'Onbehandeld' wel groter. Na zestien weken resulteerde dit in een gemiddelde besmetting van bijna 30.000 *R. similis* per plant.

Uit de resultaten van 'Onbehandeld' blijkt dat de eerste larven tussen twee en vier weken na het inoculeren worden gevormd. De controle op steriliteit van de door UV-bestraalde aaltjes kan dus na vier weken plaatsvinden.

**Tabel 5 -** Effect van UV-bestraling op het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* in drainwater en op de populatie-ontwikkeling in *Anthurium andreaeanum* bij een transmissiewaarde (T) van 15% en een stroomsnelheid van 2500 liter/uur

Weken na inoculatie	Aantal <i>R. similis</i> /plant (% volwassen, % larven)	
	UV-stralen	Onbehandeld
1	7 ( 83, 17)	53 (77, 23)
2	23 ( 88, 12)	81 (88, 12)
4	19 ( 90, 10)	935 (16, 84)
8	7 (100, 0)	2.930 (32, 68)
12	5 (100, 0)	16.611 (35, 65)
16	0 ( 0, 0)	29.977 (30, 70)
Doding (%) <sup>a</sup>	2 (14) <sup>b</sup>	0 (14) <sup>b</sup>
Spontaan bewegend (%)	14 ( 8) <sup>c</sup>	33 ( 8) <sup>c</sup>

<sup>a, b en c</sup> zie onder Tabel 3

Uit het totale onderzoek blijkt dat UV-straling een ideale methodiek is om aaltjes in voedingsoplossing onschadelijk te maken. Om schimmels en bacteriën uit te schakelen wordt voor de praktijk een UV-dosis geadviseerd van 100 mJ/cm<sup>2</sup>. Met het UV-apparaat dat in dit onderzoek is gebruikt wordt deze dosis bereikt bij een transmissiewaarde van tenminste 50% en een stroomsnelheid van 2500 liter/uur. Onder deze omstandigheden

zullen er nauwelijks spontaan bewegende aaltjes overblijven (Tabel 3). Mochten deze er nog wel zijn, dan is de levensduur zo kort dat geen aantasting wordt verwacht. Vindt er wel aantasting plaats, dan kan dit absoluut geen kwaad omdat de UV-bestraalde aaltjes steriel zijn geworden (Tabel 5). Vermeerdering vindt niet meer plaats, waardoor de populatie binnen zestien weken uitsterft. De situatie met betrekking tot het ontsmetten van water tegen aaltjes wordt nog gunstiger wanneer ook virussen moeten worden bestreden. In dat geval moet de dosis worden verhoogd naar 250 mJ/cm<sup>2</sup>.

#### **4.3 CONCLUSIES**

Uit het onderzoek naar ontsmetting van voedingsoplossing tegen het wortelnecrose-aaltje *R. similis* door middel van lagedruk UV-straling kan de volgende conclusie worden getrokken.

***R. similis* in voedingsoplossing is zeer gevoelig voor UV-straling.**

- Na blootstelling aan een geschatte dosis van 10 mJ/cm<sup>2</sup> kwamen de aaltjes nog wel tot aantasting, maar omdat ze steriel waren geworden, bleef vermeerdering uit.
- De geadviseerde dosis van 100 mJ/cm<sup>2</sup> tegen pathogene schimmels is voldoende om het wortelnecrose-aaltje *R. similis* uit te schakelen.

## 5. OZONISATIE

Waterontsmetting door ozon is een erkende toepassing in zwembaden en in de waterzuiveringsindustrie. Vanaf 1989 wordt deze methodiek ook toegepast in de glastuinbouw om schimmels, bacteriën en virussen onschadelijk te maken (Runia, 1991). Ozon is een zeer krachtig oxidatiemiddel en ontstaat door droge lucht of zuivere zuurstof bloot te stellen aan een hoog frequent spanningveld, dat wordt geleverd door een generator (Runia, 1988). Ook kan ozon worden geproduceerd door zuurstof langs een UV-lamp te leiden. In het ontsmettingsproces wordt ozon in een gesloten systeem in het te behandelen water geblazen. Het instabiele ozon ( $O_3$ ) splitst zich in een zuurstofmolecuul ( $O_2$ ) en een zuurstofatoom ( $O$ ). Dit vrije zuurstofatoom reageert met allerlei oxideerbare stoffen, waaronder pathogenen. Door het oxideren worden de pathogenen kapot gemaakt. Tegelijkertijd wordt ozon gereduceerd tot zuurstof. Hoe minder oxideerbare stoffen het water bevat hoe lager de dosis kan zijn. Tegen schimmels, bacteriën en virussen wordt een dosis geadviseerd van 10 g ozon per  $m^3$  drainwater per uur (Runia, 1990). Informatie over doding van aaltjes door ozon ontbrak. Vanaf 1992-1995 is in samenwerking met Lever Otarès - thans DiverseyLever geheten - het effect van ozon tegen aaltjes onderzocht. De eerste proeven zijn uitgevoerd in een proefopstelling op een locatie van Lever Otarès. Na de oriënterende fase is het onderzoek op twee Anthuriumbedrijven voortgezet met een Ozomatic 20, een apparaat dat door Lever Otarès is ontwikkeld. Op deze bedrijven was het vermoeden aanwezig dat 10 g ozon per  $m^3$  drainwater per uur, wat tegen schimmels, bacteriën en virussen wordt geadviseerd, niet voldoende zou zijn om verspreiding van het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* te voorkomen. In dit rapport wordt verslag gedaan van het onderzoek met de Ozomatic 20. Het doel van dit onderzoek is nagaan hoelang met aaltjes besmet door een Ozomatic 20 moet worden behandeld om aantasting door aaltjes te voorkomen.

### 5.1 MATERIALEN EN METHODEN

Het onderzoek met de Ozomatic 20 is uitgevoerd op twee bedrijven in de praktijk. Op bedrijf I groeiden de planten in oasis en op bedrijf II in kleikorrels. Op beide bedrijven was een zelfde Ozomatic 20-configuratie aanwezig. In de Ozomatic wordt ozon geproduceerd door droge lucht bloot te stellen aan een hoog frequent spanningveld. Beide installaties produceerden 20 g ozon per uur dat via een injector in het te behandelen drainwater werd geblazen. Daarvoor werd het drainwater vanuit de vuilwatertank tijdens het vullen van de behandeltank langs de injector gepompt. In het onderzoek op bedrijf I werd gedurende het vullen van de behandeltank wel ozon geïnjecteerd, maar op bedrijf II niet. Op het tweede bedrijf is het ozonisatie-proces gestart nadat de behandeltank was gevuld. Tijdens het vullen van de behandeltank, dat ongeveer vijf minuten per  $m^3$  in beslag nam, zijn de aaltjes vóór de ozoninjector in de aanvoerstroom aangebracht. Na het vullen waren er op beide bedrijven in de behandeltank ongeveer 500 *R. similis* per liter drainwater aanwezig. Voordat het vulproces werd gestart, was het water in de vuilwatertank aangezuurd tot een pH van 4. Een ozonbehandeling is bij een pH van 4 namelijk effectiever tegen micro-organismen dan bij de normale pH van ongeveer 6. Dit komt doordat ozon in een zure omgeving stabiel is (Farooq et al, 1977). Op bedrijf I zijn na enkele oriënterende proeven twee proeven uitgevoerd. In beide proeven is gestart met drainwater met een CZV-waarde van 25 mg  $O_2$ /liter. (CZV: Chemisch Zuurstof Verbruik geeft aan hoeveel zuurstof er per liter water nodig is om de oxideerbare bestanddelen te oxideren). Het enige verschil tussen beide proeven was de hoe-



veelheid te behandelen drainwater, namelijk 1 en 2 m<sup>3</sup>. Op bedrijf II zijn op twee dagen proeven uitgevoerd. Op de eerste dag betrof het een oriënterende proef waarbij 1 m<sup>3</sup> drainwater met een CZV-waarde van 32 mg O<sub>2</sub>/l is ontsmet. Op de tweede dag ging het om vier proeven, waarbij in alle proeven 1 m<sup>3</sup> drainwater is ontsmet, maar met verschillende CZV-waarden. Er is gekozen voor verschillende CZV-waarden omdat uit het bemonsteren van drainwater in de vuilwatertanks op zes Anthurium-bedrijven is gebleken dat de CZV-waarde sterk kan variëren. Op deze bedrijven werden de volgende CZV-waarden gevonden: 16 (lava), 36 (steenwol), 46 (oasis), 53 (steenwol), 132 (lava) en 146 mg O<sub>2</sub>/l (oasis). Tussen haakjes is het substraat aangegeven waarin werd geteeld. In de proeven op bedrijf II zijn vier verschillende CZV-waarden gecreëerd door aan het drainwater magere melk toe te voegen in hoeveelheden van 0, 40, 200 en 1000 ml per m<sup>3</sup>. Dit leverde CZV-waarden op van respectievelijk 11, 18, 34 en 116 mg O<sub>2</sub>/liter. Per 100 ml bevatte de magere melk 4,0 g eiwit, 5,0 g koolhydraten (melksuikers) en 0,05 g natrium, maar geen vetten of andere stoffen.

Voor, tijdens en na afloop van het ozonisatie-proces zijn monsters uit de behandel-tank genomen om de voortgang van het proces te volgen. Op bedrijf I ging het om monsters van 20 liter en op bedrijf II om monsters van 5 liter. Met behulp van een 25 µm-zeef zijn de aaltjes verzameld. Op welke tijdstippen er is bemonsterd, is aangegeven in onderstaande tabellen. Ook is regelmatig de redoxpotentiaal, kortweg redox, op de Ozomatic 20 afgelezen en genoteerd om na te gaan welk verband er is tussen de redox en de ontsmetting. De redox wordt uitgedrukt in mV en is een maat voor de interactie van de reductie van ozon en de oxidatie van oxideerbare stoffen in het water.

Het effect van de ozonbehandelingen is bepaald aan de hand van het bewegend vermogen van de aaltjes (bedrijf I en II) en op basis van het feit of er na inoculatie wel of geen aantasting ontstaat (bedrijf I). In alle proeven is één dag na het behandelen het bewegend vermogen van de aaltjes bepaald en zijn in de proeven op het eerste bedrijf anthuriums geïnoculeerd met ongeveer 3800 *R. similis* per plant (twee planten/behandeling). Veertien weken later zijn de wortels van de planten bemonsterd en onderzocht op aanwezigheid van *R. similis*.

## 5.2 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### • Bedrijf I

In Tabel 6 zijn de resultaten opgenomen van het ontsmetten van drainwater met behulp van een Ozomatic 20 op bedrijf I. In beide proeven is gestart met drainwater met een CZV-waarde van 25 mg O<sub>2</sub>/l. Op acht tijdstippen tijdens het ozonisatie-proces zijn 20 liter-monsters genomen voor het bepalen van het effect op 1) de CZV-waarde, 2) het spontaan bewegend vermogen en 3) de aantasting. Na verwerking van de monsters over een 25 µm-zeef waren er in de monsters gemiddeld 7700 *R. similis* aanwezig. Daarvan zijn honderd aaltjes gecontroleerd op het spontaan bewegend vermogen. Met de resterende aaltjes zijn twee anthuriums geïnoculeerd om na te gaan welke behandel-tijd nodig is om aantasting te voorkomen. Uit Tabel 6 blijkt dat de suspensie waarmee het drainwater in de behandel-tank is besmet 81% spontaan bewegende *R. similis* bevatte. Nadat de tank was gevuld, met de inwerking zijnde ozoninjector, bevatte het drainwater in proef 1 (5 min.) 74% spontaan bewegende *R. similis* en 82% in proef 2 (10 min.). Naarmate de behandel-tijden toenamen, verminderden de percentages spontaan bewegende aaltjes. Een 100% afname van het spontaan bewegend vermogen werd in proef 1 (1 m<sup>3</sup>) na één uur behandelen bereikt en in proef 2 (2 m<sup>3</sup>) na twee uur. Alleen

**Tabel 6 -** Effect van een Ozomatic 20 op bedrijf I ter ontsmetting van 1 en 2 m<sup>3</sup> drainwater met een CZV-waarde van 25 mg O<sub>2</sub>/l en besmet met het wortelneecrose-aaltje *Radopholus similis*

Proef	Behandel- tijd (min.)	Redox (mV)	CZV (mg O <sub>2</sub> /l)	Spontaan bewegend <sup>1)</sup>		Aantasting <sup>2)</sup>	
				a	b	a	b
proef 1  1 m <sup>3</sup>	0	-	25	81	0	8600	0
	5	552	26	74	9	8025	7
	15	572	-	46	43	6100	29
	22	760	25	-	-	-	-
	30	920	-	17	79	953	89
	45	1050	-	4	95	110	99
	60	1113	-	0	100	0	100
	75	1130	19	0	100	0	100
proef 2  2 m <sup>3</sup>	0	-	25	81	0	8600	0
	10	897	21	82	-1	7900	8
	30	679	-	55	32	6370	26
	35	760	20	-	-	-	-
	60	1010	-	9	89	258	97
	90	1108	-	1	99	23	99,7
	120	1132	-	0	100	0	100
	150	1138	13	0	100	0	100

<sup>1)</sup> a: % spontaan bewegende *R. similis* één dag na het behandelen.

b: bestrijdingseffect = % afname spontaan bewegend vermogen ten opzichte van 'Onbehandeld' (= 0 min.).

<sup>2)</sup> a: aantal *R. similis*/10 g wortels van *Anthurium andreanum* veertien weken na het inoculeren.

b: bestrijdingseffect = % afname in aantasting ten opzichte van 'Onbehandeld' (= 0 min.).

bij deze en langere behandelzeiten werden geen *R. similis* in de wortels aangetroffen. Dit betekent dat aantasting alleen dan wordt voorkomen wanneer er geen spontaan bewegende aaltjes meer aanwezig zijn. In beide proeven was dat het geval na een behandeling met 20 g ozon/m<sup>3</sup> drainwater per uur. Ten opzichte van de dosering van 10 g ozon/m<sup>3</sup> drainwater per uur tegen schimmels, bacteriën en virussen is de dosering tegen aaltjes dus een verdubbeling, wat een halvering van de ontsmettingscapaciteit betekent. Wat betreft de redoxpotentiaal, in proef 1 is de waarde van 760 mV na 22 minuten bereikt en in proef 2 na 35 minuten. In het verleden werd er vanuit gegaan dat met het bereiken van een redox van 750 mV de ontsmetting was voltooid. Later is men daarop teruggekomen, omdat in de praktijk een redox van 750 mV niet altijd wordt bereikt. Ozon reageert namelijk niet alleen met micro-organismen, maar ook met gewasbeschermingsmiddelen en meststoffen (Runia, 1990 en 1992). Omdat een dosering van 10 g ozon/m<sup>3</sup> drainwater per uur voldoende bleek te zijn om pathogene schimmels, bacteriën en virussen uit te schakelen, werd de redox-waarde als maat voor de ontsmetting verlaten en werd dit het nieuwe advies tegen genoemde pathogenen. Uit de aaltjesproeven op bedrijf I is gebleken dat voor het uitschakelen van aaltjes zelfs een redox van 750 mV onvoldoende is. Uitgaande van drainwater met een CZV van 25 mg O<sub>2</sub>/l werd aantasting voor 100% pas voorkomen bij redoxwaarden van meer dan 1100 mV.

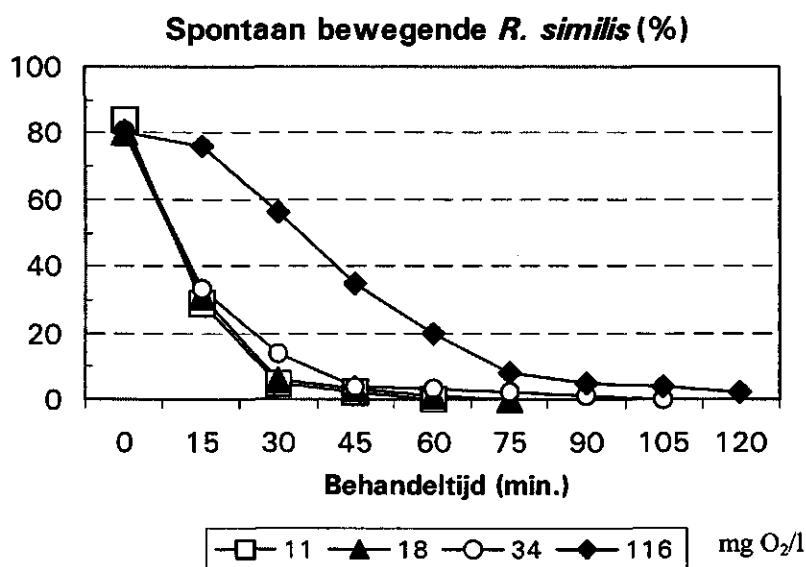
#### • Bedrijf II

De resultaten van de oriënterende proef met een CZV-waarde van 32 mg O<sub>2</sub>/l zijn opgenomen in Tabel 7. Ook de resultaten van de volgende vier proeven met verschillende CZV-waarden staan in deze tabel. In de proeven op bedrijf II is het resultaat alleen beoordeeld op basis van het spontaan bewegend vermogen. Met het behandelde drainwater zijn geen planten besmet. Uit eerder onderzoek is namelijk gebleken dat afwezigheid van spontaan bewegende aaltjes voorwaarde is om aantasting te voorkomen. Uit de

resultaten in Tabel 7 en Figuur 6 (proef 1 t/m 4) blijkt dat de CZV-waarde een zeer grote invloed heeft op het ontsmettingsproces. Naarmate de CZV-waarde toenam, waren er langere behandelzeiten nodig om het spontaan bewegend vermogen tot nul te reduceren. In het onbehandelde drainwater was 80 tot 84% van de aaltjes spontaan bewegend. Om het spontaan bewegend vermogen uit te schakelen, moest het drainwater met CZV-waarden van 11, 18 en 34 mg O<sub>2</sub>/l respectievelijk 60, 75 en 105 minuten worden behandeld met 20 g ozon/m<sup>3</sup>. Bij de CZV-waarde van 116 mg O<sub>2</sub>/l was daarvoor zelfs een behandelzeit nodig van meer dan 120 minuten. Omdat onder praktijkomstandigheden CZV-waarden van 18 mg O<sub>2</sub>/l en hoger heel gebruikelijk zijn, moet er dus rekening mee worden gehouden dat zelfs 20 g ozon/m<sup>3</sup> drainwater per uur onvoldoende is om alle aaltjes uit te schakelen. Daarmee wordt ozonisatie als ontsmettingsmethodiek een zeer kostbare aangelegenheid.

Uit vergelijking van de resultaten van de proeven met nagenoeg dezelfde CZV-waarden, namelijk 32 mg O<sub>2</sub>/l (oriënterende proef) en 34 mg O<sub>2</sub>/l (proef 3) blijkt de CZV-waarde geen goede maat te zijn voor de duur van de behandeling. In de oriënterende proef was het spontaan bewegend vermogen na 60 minuten tot nul gereduceerd, terwijl voor het bereiken van hetzelfde resultaat in de proef met toevoeging van magere melk daarvoor 105 minuten nodig waren. De CZV-waarde zegt niets over de aard van de te oxideren bestanddelen. Bij gelijke CZV-waarden kan het zijn dat in het ene geval de aaltjes misschien gemakkelijker en dus eerst worden geoxideerd, terwijl in het andere geval eerst de andere bestanddelen worden geoxideerd.

Evenals op bedrijf I bleek ook nu weer dat een redoxwaarde van 750 mV niet altijd een garantie is voor een 100% effectieve werking. Naarmate de CZV-waarde hoger was, werd dit effect bij een lagere redoxwaarde bereikt. Omdat noch op basis van de CZV-waarde, noch op basis van de redoxwaarde kan worden aangegeven hoelang er moet worden ontsmet, kunnen er voor het ontsmetten door middel van ozon geen algemeen



**Figuur 6 -** Ontsmettende werking van een Ozomatic 20 in relatie tot de CZV-waarde (mg O<sub>2</sub>/l) en de behandelzeit

**Tabel 7 -** Effect van een Ozomatic 20 op bedrijf II ter ontsmetting van 1 m<sup>3</sup> drainwater met één CZV-waarde (oriënterende proef) en vier CZV-waarden. Drainwater is kunstmatig besmet met het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis*

Proef	Behandeltijd (min.)	Redox (mV)	CZV (mg O <sub>2</sub> /l)	Spontaan bewegend <sup>1)</sup>	
				a	b
Oriënterende proef					
	0	400	32	69	0
Drainwater zonder toe- voeging	15	538	-	31	55
	30	874	-	6	91
	45	993	-	2	97
	60	1014	24	0	100
	75	1021	-	0	100
	90	1021	17	0	100
Proef met vier CZV-waarden					
proef 1	0	431	11	84	0
	15	967	-	29	65
0 ml magere melk	30	1045	-	5	94
	45	1075	-	2	98
	60	1080	11	0	100
proef 2	0	660	18	80	0
	15	765	-	31	61
40 ml magere melk	30	902	-	6	92
	45	928	-	3	96
	60	932	-	1	99
	75	936	-	0	100
	90	933	13	0	100
proef3	0	585	34	81	0
	15	552	-	33	59
200 ml magere melk	30	590	-	14	83
	45	693	-	4	95
	60	762	-	3	96
	75	783	-	2	98
	90	762	-	1	99
	105	764	-	0	100
	120	760	21	0	100
proef 4	0	469	116	80	0
	15	390	-	76	5
1000 ml magere melk	30	375	-	56	30
	45	398	-	35	56
	60	424	-	20	75
	75	453	-	8	90
	90	483	-	5	94
	105	512	-	4	95
	120	535	96	2	98

<sup>1)</sup> a: % spontaan bewegende *R. similis* één dag na het behandelen.

b: bestrijdingseffect = % afname spontaan bewegend vermogen ten opzichte van 'Onbehandeld' (= 0 min.).

geldende regels worden gegeven. Daarbij komt dat gedurende de teelt de CZV-waarde en de aard van de oxideerbare bestanddelen kunnen fluctueren. Dit betekent dat het resultaat van de ontsmetting altijd onzeker blijft.

Het vermoeden dat 10 g ozon/m<sup>3</sup> per uur onvoldoende is om verspreiding van aaltjes te voorkomen, is door dit onderzoek bevestigd. Dit heeft er toe geleid dat op bedrijven, die ontsmetten tegen aaltjes, de bestaande Ozomatic is uitgebreid met een UV-gedeelte.

### 5.3 CONCLUSIES

Uit het onderzoek naar de ontsmetting van drainwater tegen het wortelnecrose-aaltje *R. similis* door middel van ozon (Ozomatic 20) kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

***R. similis* in voedingsoplossing laat zich niet gemakkelijk door ozon uitschakelen. Hiervoor is tenminste 20 g ozon/m<sup>3</sup> per uur voor nodig.**

- Het ontsmetten is alleen dan 100% effectief wanneer er direct na het ontsmetten geen spontaan bewegende aaltjes meer aanwezig zijn.
- Naarmate de CZV-waarde van het te behandelen water hoger was, werden de aaltjes minder snel onschadelijk gemaakt. Bij CZV-waarden van  $\geq 34$  mg O<sub>2</sub>/l was daarvoor meer dan 20 g ozon/m<sup>3</sup> per uur voor nodig.
- Afhankelijk van de samenstelling van het drainwater kan de ontsmettingstijd bij gelijke CZV-waarden variëren.
- De redoxwaarde is evenals de CZV-waarde geen goede maat voor het bepalen van de ontsmettingstijd.

## 6. WATERSTOFPEROXIDE

Waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) is een zwak oxidatiemiddel. Door toevoeging van activators in de vorm van organische zuren kan de effectiviteit worden verbeterd, waardoor plantpathogenen in drainwater kunnen worden uitgeschakeld. Runia en Paternotte (1993) hebben in een proef met verschillende concentraties en behandelzeiten aangetoond dat sporen van *Pythium* bij een concentratie van 50 dpm (delen per miljoen) al na vijf minuten zijn gedood. Een concentratie van 100 dpm en dezelfde behandelzeit was nodig voor het doden van sporen van *Fusarium*. Virussen laten zich moeilijker doden. Daarvoor is tenminste 400 dpm nodig. In aansluiting op dit onderzoek is nagegaan bij welke concentraties en behandelzeiten het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* zich laat doden. Dit onderzoek is evenals voornoemd onderzoek uitgevoerd in samenwerking met Kemira Peroxides B.V., thans Kemira Agro Rozenburg B.V. geheten.

Het doel van dit onderzoek is nagaan bij welke concentraties van  $H_2O_2$  + activators en behandelzeiten aaltjes in drain-water niet meer tot aantasting in staat zijn.

### 6.1 MATERIALEN EN METHODEN

In de proeven is gebruik gemaakt van  $H_2O_2$  met mierenzuur als activator. Wanneer over een dosering wordt gesproken, dan wordt alleen de hoeveelheid  $H_2O_2$  bedoeld.

Uit een oriënterende proef, waarin gedurende tien minuten behandelingen zijn uitgevoerd met 0, 50, 100 en 200 dpm  $H_2O_2$ , bleek dat zelfs de hoogste concentratie tot geen enkele bestrijding van *R. similis* in staat was. Dit was aanleiding tot het uitvoeren van de tweede proef met concentraties van 0 tot 1600 dpm  $H_2O_2$  en behandelzeiten van 10 en 60 minuten. Deze proef is niet in dit rapport beschreven, omdat achteraf bleek dat de vitaliteit van de aaltjes slecht is geweest. De vitaliteit kan worden afgemeten aan het bewegend vermogen van de aaltjes. Hoe hoger het percentage bewegende aaltjes is, hoe vitaler de aaltjespopulatie. In deze proef was slechts 37% van de aaltjes tot bewegen in staat. Vanwege de geringe vitaliteit zijn de resultaten van de proef in het voordeel van het ontsmettingsmiddel uitgevallen.

In de derde proef, die in onderstaand gedeelte is beschreven, was wel sprake van een vitale aaltjespopulatie. De populatie bevatte 99% bewegende *R. similis*, waarvan 75% spontaan bewegend. Deze aaltjespopulatie is gebruikt voor het testen van twee formuleringen met geactiveerde waterstofperoxide. Het betrof de gangbare formulering (oud) en een experimentele formulering (nieuw). Het verschil tussen beide formuleringen is niet aan ons bekend gemaakt. De gangbare formulering is ook in de eerste twee proeven gebruikt en in het onderzoek naar de ontsmetting tegen schimmels en virussen (Runia en Paternotte, 1993 en Runia, 1995). De gangbare formulering is in vier concentraties getest, namelijk 50, 200, 200 en 400 dpm  $H_2O_2$  en de experimentele formulering alleen in een concentratie van 200 dpm  $H_2O_2$ . De proef bevatte ook een behandeling zonder waterstofperoxide: 'Onbehandeld'. De behandelingen zijn uitgevoerd in plastic emmers met 20 liter drainwater (pH 6,3; EC; 1,1 mS/cm) afkomstig van anthuriums, geteeld in oasie. Nadat elke emmer geïnoculeerd was met 5000 *R. similis* per liter drainwater is geactiveerde waterstofperoxide toegevoegd. Er zijn vier behandelzeiten gerealiseerd: 1, 2, 6 en 24 uur. Na het verstrijken van de behandelzeiten is na menging uit elke emmer een monster van 4 liter drainwater genomen. De monsters zijn tot iets minder dan een halve liter teruggebracht door ze over een 25  $\mu$ m-zeef te laten lopen en de aaltjes vervolgens van de zeef te spoelen met ongeveer 400 ml water. De volgende dag zijn de aaltjes geteld en gecontroleerd op het bewegend vermogen. Een dag later

zijn hiermee drie Anthurium-planten per behandeling geïnoculeerd. De in potgrond opgepotte planten zijn geïnoculeerd met gemiddeld 5060 *R. similis* per plant. Zestien weken later zijn de wortels bemonsterd en onderzocht op aanwezigheid van *R. similis*.

## 6.2 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### *Spontaan bewegend vermogen*

De resultaten van de beoordelingen op het bewegend vermogen van *R. similis* zijn opgenomen in Tabel 8. Voor elke behandeling is aangegeven a) het percentage spontaan bewegende aaltjes en b) het bestrijdingseffect, berekend op basis van het aantal spontaan bewegende aaltjes volgens formule 2. In Figuur 7 zijn de percentages spontaan bewegende aaltjes grafisch weergegeven.

Uit Tabel 8 blijkt dat de onbehandelde aaltjespopulaties rond de 75% spontaan bewegende aaltjes bevatten. Onder invloed van de behandelingen nam het spontaan bewegend vermogen sterk af (Figuur 7). Maar bij geen van de behandelingen met de oude formulering werd het spontaan bewegend vermogen tot nul gereduceerd. Minimaal bleven er bij de oude formulering nog 0,3% spontaan bewegende aaltjes over, wat een bestrijdingseffect opleverde van 99,7%. Dit was het geval bij de behandeling met 400 dpm en een behandeltime van 24 uur. Bij een concentratie van 100 dpm van de oude formulering – dit is de adviesdosering tegen schimmels – en behandelzeiten van 1, 2, 6 en 24 uur werden bestrijdingseffecten verkregen van respectievelijk 13%, 59%, 73% en 97%. De nieuwe formulering leverde wel een bestrijdingseffect van 100% op. Bij de concentratie van 200 dpm was hiervoor een behandeltime nodig van 24 uur (Tabel 8). De nieuwe formulering is ongeveer even effectief als de dubbele concentratie van de oude formulering (Figuur 7).

### *Wortelaantasting*

Tabel 9 laat zien a) hoeveel *R. similis* er zestien weken na het inoculeren per 10 g wortels aanwezig waren en b) tot welke bestrijdingseffecten de behandelingen hebben geleid. Voor de berekening van de bestrijdingseffecten op basis van de wortelaantastingen is formule 3 gebruikt. In Figuur 8 is de wortelaantasting grafisch weergegeven.

Uit de resultaten blijkt dat de oude formulering alleen een aantasting heeft weten te voorkomen bij een concentratie van 400 dpm en een behandeltime van 24 uur. Bij deze behandeling was het spontaan bewegend vermogen met 99,7% afgenomen (Tabel 8). Een afname van het spontaan bewegend vermogen van 99,3% bij de behandeling met 200 dpm oud en een behandeltime van 24 uur, was echter niet voldoende om aantasting te voorkomen. Deze behandeling leverde een bestrijdingseffect op van 92%. Dat betekent dat een enkel spontaan bewegend aaltje aantasting kan opleveren. Om er dan ook zeker van te zijn dat de behandelde aaltjes geen aantasting veroorzaken, moet het ontsmetten leiden tot 100% afname van het spontaan bewegend vermogen. Dit was alleen het geval bij de behandeling met 200 dpm van de nieuwe formulering en een behandeltime van 24 uur. De behandeling met de nieuwe formulering was ook wat betreft de wortelaantasting even effectief als de dubbele concentratie van de oude formulering (Tabel 9 en Figuur 8).

Wordt de effectiviteit van het ontsmetten met waterstofperoxide tegen schimmels en aaltjes met elkaar vergeleken, dan worden schimmels veel sneller en bij lagere concentraties uitgeschakeld dan aaltjes. Voor de bestrijding van schimmels werd 100 dpm aanbevolen bij een behandeltime van vijf minuten (Runia en Paternotte, 1993). Tegen aaltjes heeft deze behandeling geen enkel effect. Om aantasting wel te voorkomen is

**Tabel 8 -** Effect van behandeltime en concentratie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oude en nieuwe formulering) op het spontaan bewegend vermogen van *Radopholus similis* in drainwater

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (dpm)	Spontaan bewegend vermogen van <i>R. similis</i> (1 dag na de behandeling)							
	1 uur		2 uur		6 uur		24 uur	
	a <sup>1)</sup>	b <sup>2)</sup>	a	b	a	b	a	b
Onbehandeld	76	0	75	0	75	0	75	0
oud								
50	76	0	66	12	66	12	42	44
100	66	13	31	59	20	73	2	97
200	41	46	14	81	4	95	0,5	99,3
400	33	57	6	92	0,8	99	0,3	99,7
nieuw								
200	29	62	7	91	0,7	99	0	100

<sup>1)</sup> a: percentage spontaan bewegende *R. similis*.

<sup>2)</sup> b: bestrijdingseffect (= procentuele afname spontaan bewegende *R. similis* ten opzichte van 'Onbehandeld').

**Tabel 9 -** Effect van behandeltime en concentratie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oude en nieuwe formulering) op de wortelaantasting van *Anthurium andreaeanum* cv. Acropolis zestien weken na het inoculeren met 5000 *Radopholus similis* per plant

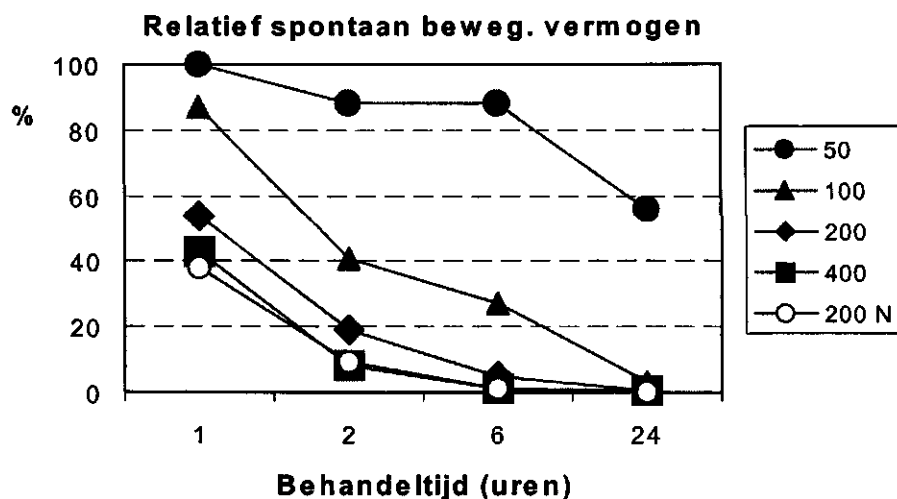
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (dpm)	Wortelaantasting door <i>R. similis</i>							
	1 uur		2 uur		6 uur		24 uur	
	a <sup>1)</sup>	b <sup>2)</sup>	a	b	a	b	a	b
Onbehandeld	4184	0	4200	0	4550	0	3783	0
oud								
50	4017	4	3950	4	4334	5	3382	11
100	3920	6	3759	8	3809	16	2642	30
200	3888	7	3800	10	3320	27	302	92
400	3925	6	3325	21	395	91	0	100
nieuw								
200	3838	8	3488	17	480	89	0	100

<sup>1)</sup> a: aantal *R. similis* per 10 g wortels.

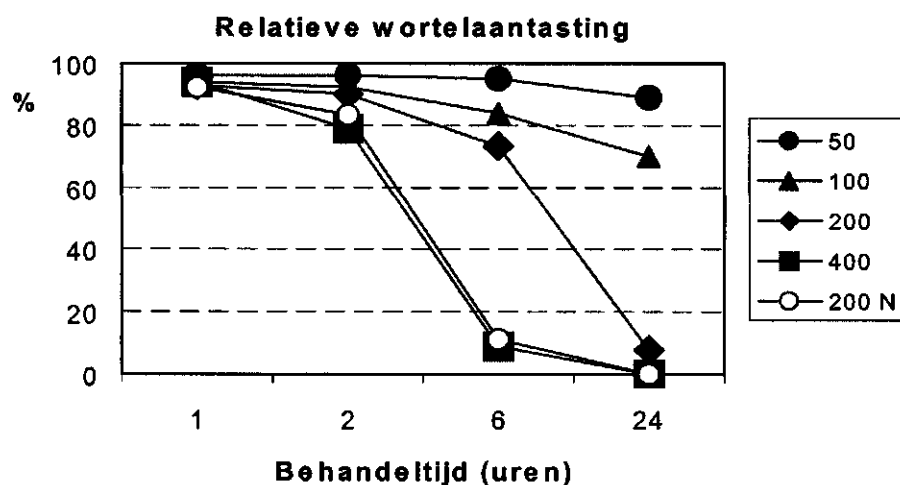
<sup>2)</sup> b: bestrijdingseffect (= procentuele afname wortelaantasting ten opzichte van 'Onbehandeld').

van de oude formulering tenminste een concentratie van 400 dpm nodig bij een behandeltime van 24 uur. Deze concentratie is echter fytotoxisch, terwijl neutraliseren te duur is. De nieuwe formulering is effectiever dan de oude. Met de nieuwe formulering worden alle aaltjes uitgeschakeld bij 200 dpm nodig en een behandeltime van 24 uur. Of ook deze concentratie fytotoxisch is, is onbekend. Maar een behandeltime van 24 uur is voor het ontsmetten van recirculerende voedingsoplossingen geen praktische toepassing. De geteste formuleringen van waterstofperoxide van Kemira Agro Rozenburg B.V. zijn voor de praktijk dus niet of nauwelijks geschikt om voedingsoplossingen te ontdoen van wortelaaltjes. Bovendien zal het resultaat, evenals dat bij het ontsmetten met ozon het geval is maar nu niet is onderzocht, afhankelijk zijn van de aard en de hoeveelheid te oxideren stoffen in het water. Dit betekent dat de concentratie en de behandeltime hierop moeten worden afgestemd. Maar omdat de aard en de hoeveelheid oxideerbare stoffen niet bekend zijn en in de tijd zullen variëren, kan niet worden aangegeven welke concentratie en behandeltime nodig zijn om alle aaltjes uit te schakelen. Vandaar dat waterstofperoxide, evenals ozon, geen betrouwbare ontsmettingsmethodiek is.





**Figuur 7 -** Effect van de concentratie (dpm)  $H_2O_2$  (oude en nieuwe formulering) en de behandeltijd op het spontaan bewegend vermogen van *Radopholus similis*



**Figuur 8 -** Relatieve wortelaantasting van Anthurium door *Radopholus similis* ten opzichte van 'Onbehandeld' in relatie tot de concentratie (dpm)  $H_2O_2$  (oude en nieuwe formulering) en de behandeltijd

### 6.3 CONCLUSIES

Uit het onderzoek naar de ontsmetting van drainwater tegen het wortelnecrose-aaltje *R. similis* door middel van  $H_2O_2$  + activators (Kemira Agro Rozenburg B.V.) kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

***R. similis* in voedingsoplossing laat zich niet gemakkelijk door waterstofperoxide uit-schakelen.**

- Voor een bestrijdingseffect van 100% was een behandeltijd nodig van 24 uur en een concentratie van 400 dpm  $H_2O_2$  (oude formulering) en 200 dpm  $H_2O_2$  (nieuwe formulering)
- Het ontsmetten is alleen 100% effectief wanneer het spontaan bewegend vermogen geheel is verdwenen.
- Ontsmetten tegen aaltjes is minder effectief dan tegen schimmels.

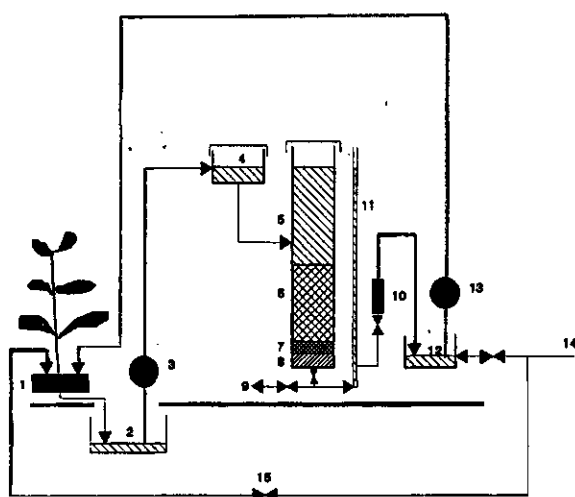
## 7. LANGZAME ZANDFILTRATIE

Langzame zandfiltratie is een zuiveringsmethodiek die in gesloten teeltsystemen in kas- sen wordt gebruikt om plantpathogenen uit recirculatiewater te verwijderen. Deze me- thodiek vormt hiermee een alternatief voor ontsmettingsmethodieken als verhitting, ozonisatie en UV-bestraling en heeft als voordeel dat zij goedkoper is in gebruik. Over de effectiviteit en het verwijderingsmechanisme van deze toepassing is echter weinig bekend. In 1994 is een oriënterende proef uitgevoerd met een zandfilter op het Proef- station voor de Boomkwekerij in Boskoop (Amsing, 1995). Uit dit onderzoek bleek dat bij een zandfractie van 0,2 tot 2,0 mm en een doorstroomsnelheid van 300 liter water per m<sup>2</sup> filteroppervlak per uur er aaltjes door het filter gaan. In 1996 is dit onderzoek met fijnere zandfracties en een lagere doorstroomsnelheid voortgezet in samenwerking met het Instituut voor Milieu- en Agritechniek (IMAG-DLO) in Wageningen. Het onder- zoek op het IMAG-DLO is hieronder weergegeven.

Het doel van het onderzoek is nagaan in hoeverre langzame zandfiltratie in staat is aal- tjes uit drainwater te verwijderen, zodat hergebruik van drainwater niet tot problemen leidt. Ook moet het onderzoek informatie opleveren over het verwijderingsmechanisme van de ziekteverwekkers.

### 7.1 MATERIALEN EN METHODEN

In een kas met tomatenplanten waren twaalf zandfilters opgesteld. Ieder zandfilter was aangesloten op een rij tomatenplanten. In Figuur 9 is in een schema een experimenteel zandfilter weergegeven en de wijze waarop dit filter in de tomatenkas was aangesloten op de recirculerende stroom voedingsoplossing.



**Figuur 9 -** Schematische opzet van het zandfilter met een recirculerende voedingsoplossing (Bron: IMAG, Wageningen)

#### *Legenda*

Drainwater van substraat (1) naar voor- raadbak (2) en via pomp (3) naar water- bak (4) vanwaar het in de zandfilter stroomde in de 1-m hoge waterkolom (5) boven het 80-cm hoge zandkolom (6). (7) en (8) zijn resp. de 10 en 15 cm dikke grindlagen. Kraan (9) wordt ge- bruikt voor het eerste vullen van het filter. Stroomsnelheidsmeter (10). Open pijp (11) geeft het drukverlies aan. In container (12) wordt het effluent verza- meld en aangevuld met verse voedings- oplossing (14). Van hieraf wordt de voe- dingsoplossing naar de plantrijen ge- pompt (13). Tijdens onderhoud en testen van de filters was pomp (13) uitgescha- keld en klep (15) geopend en stroomde verse voedingsoplossing rechtstreeks naar de planten.

**Tabel 10 - Karakterisering van de gebruikte zandfracties**

Zand	Fractie (mm)	Korrelgrootteverdeling (mm) <sup>1)</sup>				UC = D <sub>60</sub> /D <sub>10</sub> <sup>2)</sup>
		D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>60</sub>	D <sub>90</sub>	
Fijn	0,15-0,35	0,23	0,29	0,30	0,32	1,33
Middelgrof	0,2-0,8	0,51	0,62	0,64	0,75	1,27

<sup>1)</sup> D<sub>10</sub>, 50, 60, 90 : resp. 10%, 50%, 60% en 90% van het gewicht aan zand heeft een diameter die kleiner is dan opgegeven

<sup>2)</sup> UC : uniformiteitscoëfficiënt

Uit vooronderzoek in 1995 bleek dat fijn en middelgrof zand in combinatie met een doorstroomsnelheid van 100 liter water/m<sup>2</sup> filteroppervlak per uur de beste verwijdering van pathogenen opleverden (Willers et al., 1997). Een in de praktijk tot dan toe veel gebruikte doorstroomsnelheid van 300 liter/m<sup>2</sup> filteroppervlak per uur voldeed niet. Ook de grove zandfractie van 0,5-1,6 mm liet teveel pathogenen door. Op basis van deze resultaten is in 1996 het onderzoek voortgezet met fijn en middelgrof zand en een doorstroomsnelheid van 100 liter water/m<sup>2</sup> filteroppervlak per uur. Bij een filterdiameter van 15 cm resulteert deze doorstroomsnelheid in een dagelijkse doorlaat van 43,2 liter water per filter. De hoogte van het zandkolom was 80 cm. De karakteristieken van het zand staan in Tabel 10.

Zes filters waren gevuld met fijn zand en zes met middelgrof zand. Om het verwijderingsmechanisme voor aaltjes te onderzoeken zijn vijf dagen voor het begin van de proef vier van de twaalf filters gevuld met nieuw, vers zand zonder biologisch leven. In de andere acht filters met oud zand, was het zand sinds maart 1995 aanwezig. Deze filters draaiden continu in het recirculatiesysteem, waardoor veel micro-organismen in de filters aanwezig waren. Het effect van het micro-biologische leven op het uitfiltreren van aaltjes is vastgesteld door de micro-organismen in vier van de acht filters met oud zand te doden. Daarvoor zijn de filters zes dagen voordat de aaltjes aan de filters zijn toegevoegd gedurende één dag gechloreerd. Op grond van het bovenstaande bestond de proef uit zes soorten filters (Tabel 11). Van elk type filter waren er twee.

**Tabel 11 - Zes soorten filters (n = 2)**

Zandtype	Zandfractie	Code
nieuw	fijn	nf
nieuw	middelgrof	nm
oud	fijn	of
oud	middelgrof	om
oud (chloor)	fijn	ocf
oud (chloor)	middelgrof	ocm

Aan elk filter zijn 250.000 *R. similis* in het water net boven de zandkolom aangebracht. Het inoculum bestond voor 58% uit larven en 42% uit volwassen aaltjes. Van de geïnoculeerde aaltjes was 98% spontaan bewegend. Verdeeld over de larven en volwassen aaltjes was respectievelijk 4% en 0% dood, 48% en 46% bewegend na aanraking en 52% en 54% spontaan bewegend. De effectiviteit van de filters is op twee manieren beoordeeld.

- Controle op *R. similis* in het effluent

Uit het water dat uit de filters komt (effluent) zijn na roeren monsters van 1 liter geno-

men en gecontroleerd op aaltjes. Op de eerste, tweede en derde dag na inoculatie van de filters gebeurde dit dagelijks met het filtraat dat op die dagen is opgevangen. Vervolgens is tot en met dag 21 het effluent niet meer dagelijks bemonsterd, maar telkens over een periode van drie dagen. Het opgevangen effluent bestond uit 20-30% van de totale doorstroom. Op basis van deze gegevens is berekend welk deel van het inoculum gedurende de eerste 21 dagen door de filters ging. Ook op de dagen 34 en 48 na inoculatie van de filters is het effluent gecontroleerd op aaltjes. Op beide dagen zijn geen monsters uit het effluent genomen, maar zijn alle aaltjes in het effluent verzameld door het effluent over een 25 µm-zeef te laten lopen. Voordat de zandfilters met *R. similis* werden geïnoculeerd, is onderzocht of dit aaltje al in het systeem aanwezig was. Dit bleek niet het geval te zijn.

- Controle op infectie en vermeerdering

Planten van *Anthurium andreanum* cv. Acropolis werden geïnoculeerd met *R. similis* die in het effluent aanwezig waren. Hierdoor kon worden vastgesteld of de doorgelaten aaltjes nog tot infectie en vermeerdering in staat waren. Er zijn planten geïnoculeerd met aaltjes uit het effluent van dag 4-6, 10-12 en 19-21 na het inoculeren van de filters. Ook zijn planten geïnoculeerd met aaltjes uit het effluent, dat op dag 34 na de start van het filtratieproces is opgevangen. De aaltjes in het effluent zijn verzameld met behulp van een 25 µm-zeef. Veertien weken na het inoculeren van de planten zijn de wortels bemonsterd en onderzocht op aanwezigheid van *R. similis*. De wortelmonsters zijn gedurende één dag geëxtraheerd volgens de mixer-/wattenfiltermethode bij een temperatuur van 20°C.

De aantallen *R. similis* in het effluent en in de suspensies, verkregen na extractie van de wortels, zijn geteld met behulp van een stereomicroscop met onderbelichting.

## 7.2 RESULTATEN EN DISCUSSIE

- Controle op *R. similis* in het effluent

Tabel 12 laat voor de eerste 21 dagen na het inoculeren zien hoeveel *R. similis* er per liter filtraat aanwezig waren. Uitgaande van een doorlaat van 43,2 liter filtraat per dag zijn deze aantallen gebruikt voor het berekenen van de totale dagelijkse hoeveelheid doorgelaten aaltjes. Hieruit is berekend welk deel van het inoculum (250.000 aaltjes) dagelijks en cumulatief is doorgelaten (Figuur 10).

Uit Tabel 12 blijkt dat de zandfilters vrij waren van *R. similis* voordat de filters zijn geïnoculeerd. Ook toont de tabel aan dat alle filtertypes binnen één dag aaltjes doorlieten. De filters met het middelgrof zand lieten op de eerste dag de meeste aaltjes door, terwijl

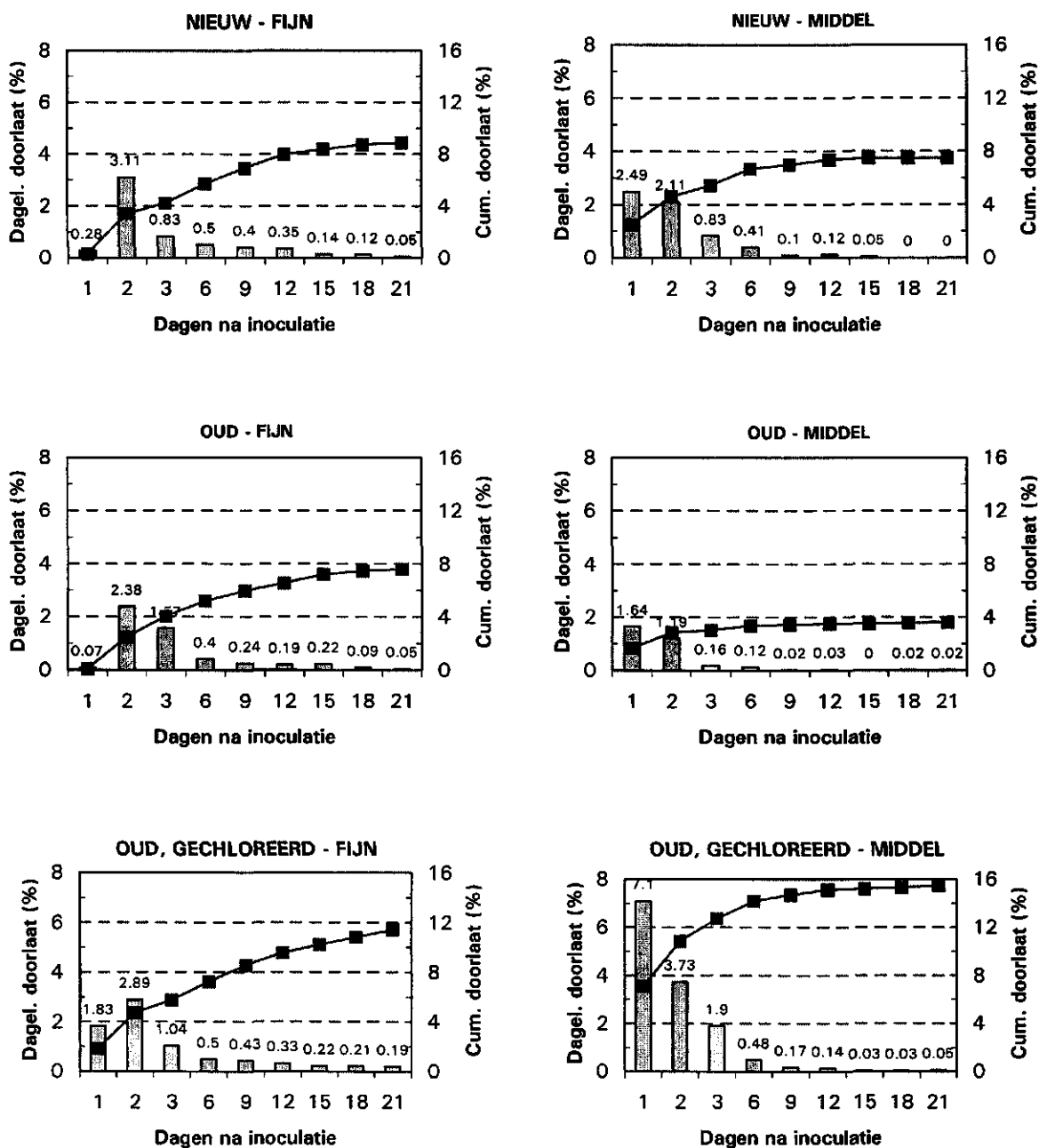
**Tabel 12 -** Doorgelaten aantallen *Radopholus similis* door diverse typen langzame zandfilters bij een doorstroomsnelheid van 100 liter water/m<sup>2</sup> filteroppervlak per uur (n = 2)

Filter <sup>1)</sup>	Doorgelaten aantal <i>R. similis</i> per liter filtraat ... dagen na inoculatie van de zandfilters									
	dag 0 <sup>2)</sup>	1	2	3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21
nf	0	16	180	48	29	23	20	8	7	3
nm	0	144	122	48	2	6	7	3	0	0
of	0	4	138	91	23	14	11	13	5	3
om	0	95	69	9	7	1	2	0	1	1
ocf	0	106	167	60	29	25	19	13	12	11
ocm	0	411	216	110	28	10	8	2	2	3

<sup>1)</sup> n = nieuw; o = oud; oc = oud, gechloreerd; f = fijn zand; m = middelgrof zand

<sup>2)</sup> Controle op dag 0 voor inoculatie van de zandfilters.

dit bij de filters met het fijne zand de tweede dag het geval was (Figuur 10). Daarna verminderde het aantal aaltjes in het effluent snel, maar ook na 48 dagen was nog een enkel aaltje in de zeefmonsters aanwezig. Hoewel het fijne zand op de eerste dag minder aaltjes doorliet dan het middelgrof zand, hebben de oude en nieuwe filters met fijn zand over een periode van 21 dagen meer aaltjes doorgelaten dan de vergelijkbare filters met het middelgrof zand (Figuur 10). Bij de zandfilters met het oude gechloreerde zand was het omgekeerde het geval.



**Figuur 10 -** Dagelijkse (kolom) en cumulatieve (lijn) percentages doorgelaten *R. similis* door zes typen langzame zandfilters ten opzichte van het inoculum (n=2)

De cumulatieve doorlaten zijn gebruikt voor het berekenen van de doorlaatpercentages. Deze percentages geven aan welk deel van het aantal aaltjes dat bovenin de filters is aangebracht (inoculum) over een periode van 21 dagen is doorgelaten (Tabel 13). Hieruit blijkt dat de oude filters gemiddeld 2,6% minder aaltjes hebben doorgelaten dan de nieuwe filters. Uit vergelijking van de resultaten van de oude filters met de gechloreerde oude filters lijkt het erop dat de verwijdering van aaltjes vooral een biologisch proces is. De oude filters lieten gemiddeld 5,6% aaltjes door, terwijl de oude, gechloreerde filters op een gemiddeld doorlaatpercentage uitkwamen van 13,4%, dus meer dan een verdubbeling. Worden de doorlaatpercentages van de oude, gechloreerde filters vergeleken met die van de filters met nieuw zand, dan wordt vermoed dat het chloreren meer gevolgen heeft gehad dan alleen het inactiveren van het biologische leven. Dit wordt afgeleid uit het feit dat de oude, gechloreerde filters aanzienlijk meer aaltjes doorlieten dan de nieuwe filters, terwijl als gevolg van het inklinken en dichtslibben juist het omgekeerde werd verwacht.

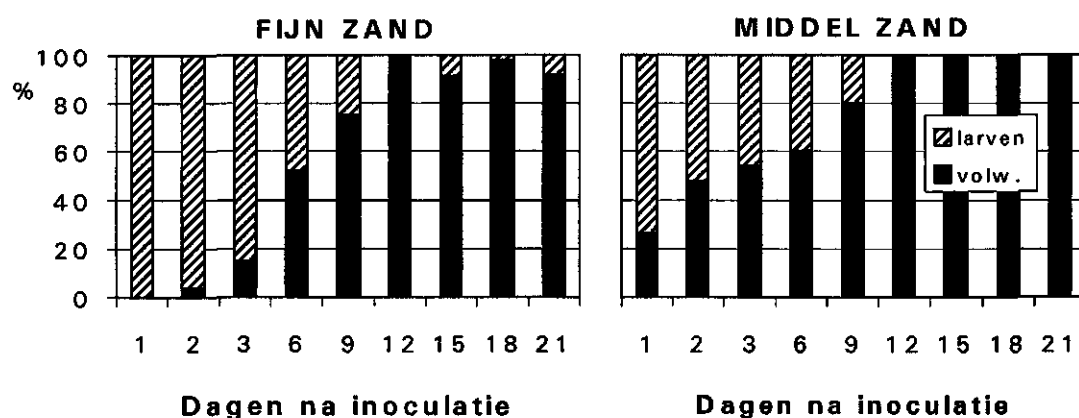
**Tabel 13 - Doorlaatpercentages van *R. similis* na 21 dagen in relatie tot het type zandfilter (n=2)**

Zandfractie	Biologische leven		
	Nieuw	Oud	Oud gechloreerd
Fijn	8,9	7,7	11,4
Middelgrof	7,5	3,6	15,5
Gemiddeld	8,2	5,6	13,4

Over het geheel genomen kunnen op basis van deze resultaten geen harde uitspraken worden gedaan over het verwijderingsmechanisme. Wel toonde deze proef aan dat zelfs de fijne zandfractie van 0,15-0,35 mm niet fijn genoeg is om alle aaltjes uit het water te verwijderen. Gemiddeld lieten de nieuwe en oude filters met fijn en middelgrof zand – de oude, gechloreerde filters niet meegerekend – over een periode van 21 dagen 7% van de in de filters aangebrachte aaltjes door.

Een interessant gegeven is het aandeel van de verschillende ontwikkelingsstadia van *R. similis* (larven en volwassen aaltjes), dat op verschillende tijdstippen na het starten van het filtratieproces werd doorgelaten. Uit Figuur 11 blijkt dat het fijne zand op de eerste dag alleen larven doorliet, terwijl in het effluent van het middelgrof zand het aandeel volwassen aaltjes toen al 26% was. Blijkbaar vertraagde de kleinere poriëngrootte van het fijne zand de doorlaat van de volwassen aaltjes. Na de eerste dag kwamen ook volwassen aaltjes door het fijne zandfilter. Berekend over het totaal aantal doorgelaten aaltjes na 21 dagen was het aandeel van de volwassen aaltjes in het effluent van de filters met fijn zand 43% en bij de filters met middelgrof zand 44%. Deze percentages blijven enigszins achter ten opzichte van het percentage van 58% larven in de suspensie waarmee de filters zijn geïnoculeerd. Vermoedelijk zijn de larven, voor wat betreft het bewegend vermogen, kwetsbaarder dan de volwassen aaltjes. Dit vermogen is nodig om door de filters te kunnen komen, wat blijkt uit het feit dat alle doorgelaten aaltjes spontaan bewogen of dit deden na aanraking. Figuur 11 lijkt het vermoeden van de grotere kwetsbaarheid van de larven te bevestigen, aangezien het aandeel larven in het effluent na negen dagen minimaal of zelfs nul was. Bij de start van de proef waren de percentages bewegende larven en volwassen aaltjes in het inoculum nagenoeg gelijk,

namelijk respectievelijk 96% (52% spontaan bewegend) en 100% (54% spontaan bewegend). Ook op dag 34 en 48 na het starten van het filtratieproces waren er nog aaltjes in het effluent aanwezig. Op beide dagen bevatte het effluent van alle twaalf filters samen respectievelijk 120 en 5 *R. similis*.



**Figuur 11 -** Aandeel larven en volwassen *R. similis* in het effluent van de filters met fijn en middelgrof zand (n = 6)

#### • Controle op infectie en vermeerdering

De resultaten van de plantinoculaties, die zijn uitgevoerd met de aaltjes in het effluent van de vierde tot en met de zesde dag, zijn opgenomen in Tabel 14. Ter vergelijking bevat deze tabel ook de resultaten van de plantinoculaties, die zijn uitgevoerd met aaltjes uit de suspensie waarmee de filters zijn geïnoculeerd (Controle). Uit Tabel 14 blijkt dat de doorgelaten *R. similis* van alle filtertypen planten hebben aangetast en zich in een tijdsbestek van veertien weken uitstekend hebben vermeerderd. De passage door de zandfilters heeft nauwelijks invloed gehad op de populatie-ontwikkeling.

Ook met de aaltjes uit het effluent van de dagen 10-12, 19-21 en 34 zijn planten geïnoculeerd. Ook deze aaltjes kwamen tot aantasting en vermeerderden zich. In het effluent van de twaalf zandfilters waren op dag 34 in totaal 120 *R. similis* aanwezig. Hiermee is één plant geïnoculeerd. Veertien weken later bevatten de wortels van deze plant 3313 *R. similis*. Dit resulteerde in een reproductiefactor (Rf) van 28x. Dus zelfs na een verblijfsduur van 34 dagen in de filters waren de aaltjes in het effluent nog tot infectie en vermeerdering in staat.

**Tabel 14 -** Resultaten van de plantinoculaties met *R. similis* aanwezig in het effluent van dag 4-6 (n = 2)

Filter <sup>1)</sup>	P <sub>i</sub> <sup>2)</sup>	P <sub>f</sub> <sup>3)</sup>	Rf <sup>4)</sup>
nf	290	8.869	31
nm	535	10.380	19
of	253	9.622	38
om	65	4.010	62
ocf	510	12.890	25
ocm	622	12.333	20
Controle	551	18.968	34

<sup>1)</sup> n = nieuw; o = oud; oc = oud, gechloreerd;  
f = fijn zand; m = middelgrof zand.

<sup>2)</sup> P<sub>i</sub> = gemiddeld aantal geïnoculeerde *R. similis* per plant.

<sup>3)</sup> P<sub>f</sub> = gemiddeld aantal *R. similis* per plant veertien weken na inoculatie.

<sup>4)</sup> Rf = reproductiefactor (P<sub>f</sub>/P<sub>i</sub>).

### 7.3 CONCLUSIES

Uit het onderzoek naar drainwaterontsmetting van het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* met behulp van langzame zandfiltratie bij een doorstroomsnelheid van 100 liter per m<sup>2</sup> filteroppervlak per uur kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

***R. similis* kon niet door de zandfilters uit het drainwater worden verwijderd of onschadelijk worden gemaakt.**

- De fijnste zandfractie van 0,15-0,35 mm verwijderde over een periode van 21 dagen 90,7% van de aaltjes uit het drainwater. Zelfs 48 dagen na het aanbrengen van de aaltjes in de filters, kwamen er nog aaltjes uit de filters.
- De doorgelaten aaltjes waren in staat tot infectie en vermeerdering.



## 8. OVERZICHT ONTSMETTINGSMETHODIEKEN

In Tabel 15 zijn alle waterontsmettingsmethodieken tegen het wortelnecrose-aaltje *Radopholus similis* op een rijtje gezet. Hiermee is een overzicht gegeven van de voorwaarden waaraan moet worden voldaan om de larven en de volwassen exemplaren van *R. similis* uit te schakelen. Om een vergelijking te kunnen maken met het ontsmetten tegen schimmels zijn ook daarvoor de voorwaarden opgenomen. Deze voorwaarden zijn gebaseerd op de resultaten van het onderzoek, dat is uitgevoerd door W.Th. Runia, werkzaam op PBG-locatie Naaldwijk.

Tabel 15 - Overzicht van de ontsmettingsmethodieken en -voorwaarden waaraan moet worden voldaan om het wortellesie-aaltje *Radopholus similis* in water uit te schakelen

Onderzoek- methodiek	AALTJES ( <i>R. similis</i> )		SCHIMMELS	
	voorwaarden	advies <sup>1)</sup>	voorwaarden	advies
<b>Verhitting</b> (warmwaterbak)	50 °C – 2 minuten 52,5°C – 30 sec.	+ +	95°C – 30 sec. of 85°C – 3 minuten	+ +
<b>UV-straling</b> (lage- en hogedruk UV)	ca. 10 mJ/cm <sup>2</sup>	+	100 mJ/cm <sup>2</sup>	+
<b>Ozonisatie</b> (Ozomatic 20)	≥20 g ozon/m <sup>3</sup> per uur	–	10 g ozon/m <sup>3</sup> per uur	+
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + activators</b>	onduidelijk door variatie in organische stofgehalte	–	onduidelijk door variatie in organische stofgehalte	–
<b>Langzame zandfiltratie</b> (zandfractie: 0,15-0,35 mm; 100 liter water/m <sup>2</sup> zandoppervlak per uur)	doorlaat: ca. 8% aaltjes	–	alleen tegen <i>Pythium</i> en <i>Phytophthora</i>	±

<sup>1)</sup> + = aanbevolen methodiek; ± = selectieve methodiek; – = methodiek niet aanbevolen.

<sup>2)</sup> Oude en nieuwe formulering.

In Tabel 15 is aangegeven dat voor het ontsmetten van water tegen *R. similis* alleen verhitting en UV-straling worden aanbevolen. Beide methodieken zijn bovendien effectiever tegen aaltjes dan tegen schimmels. Worden de ontsmettingsvoorwaarden voor schimmels aangehouden, dan is het wortelnecrose-aaltje *R. similis* allang uitgeschakeld. Dit geldt dan ook voor andere soorten wortelaaltjes. Verhitting wordt ook nog op commerciële schaal getest tegen *R. similis* en schimmels. Het gaat hier dus nog om voorlopige adviezen.

De overige drie methodieken, die niet voor ontsmetting tegen aaltjes worden aanbevolen, zijn daarentegen juist effectiever tegen schimmels. Ozonisatie en waterstofperoxide kunnen wel tegen aaltjes worden gebruikt, maar de in Tabel 15 vermelde ontsmettingsvoorwaarden gelden voor gunstige omstandigheden. Het betreft hier dus minimale voorwaarden waaraan moet worden voldaan om 100% effectief te zijn. Deze voorwaarden zijn echter al dermate hoog (≥ 20 g ozon/m<sup>3</sup> per uur; ≥ 200 dpm waterstofperoxide gedurende 24 uur) dat ontsmetting door middel van ozon en waterstofperoxide minder rendabel is dan verhitting en UV-straling. Zijn bovendien de omstandigheden minder gunstig, doordat er meer oxideerbare stoffen in het water zitten, dan moet er langer worden ontsmet. Omdat de samenstelling van het water, wat betreft de hoeveelheid en de aard van de oxideerbare stoffen, in de tijd sterk kan variëren, kan nooit met zekerheid worden aangegeven hoelang er met ozon en waterstofperoxide moet worden ontsmet om 100% effectief te zijn. Dit maakt dat deze ontsmettingsmethodieken altijd een bepaalde onzekerheid met zich meebrengen. Vandaar dat ozon en waterstofperoxi-

de niet tegen aaltjes worden aanbevolen. Om dezelfde reden wordt waterstofperoxide ook niet meer tegen schimmels geadviseerd. Tegen aaltjes maken bovendien de te hoge, fytotoxische doseringen van waterstofperoxide het onmogelijk om dit middel te adviseren.

Langzame zandfiltratie met een zandfractie van 0,15 tot 0,8 mm en een doorstroomsnelheid van 100 liter drainwater/m<sup>2</sup> zandoppervlakte per uur wordt voor ontsmetting tegen aaltjes ten sterkste afgeraden, omdat deze filtratiemethode aaltjes doorlaat. Tegen schimmels is langzame zandfiltratie alleen effectief voor *Pythium* en *Phytophthora*.

## **DANKWOORD**

Een woord van dank is op zijn plaats aan de firma's die een bijdrage hebben geleverd aan het onderzoek naar waterontsmettingsmethodieken tegen wortelaaltjes. Onze dank gaat uit naar Wedeco B.V. voor het ontsmetten door middel van UV-straling, Diversey-Lever en twee praktijkbedrijven voor het testen van de ozoninstallaties, Kemira Agro Rozenburg B.V. voor het testen van de effectiviteit van waterstofperoxide. Voor het testen van de installaties met langzame zandfiltratie is het PBG dank verschuldigd aan het Proefstation voor de Boomkwekerij en het IMAG.

# LITERATUUR

## GEREFEREERDE LITERATUUR

- Amsing, J.J., 1995. Langzaam-zandfilter laat nog aaltjes door: drainwaterontsmetting tegen *Radopholus similis*. *Vakblad voor de Bloemisterij* 26: 43.
- Anonymous, 1989. Glastuinbouw: Duurzame bedrijfssystemen. In: *Structuurnota Landbouw: 77-81* (Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Den Haag).
- Farooq, S., E.S.K. Chian and R.S. Engelbrecht, 1977. Basic concepts in disinfection with ozone. *J. Water Poll. Control Fed.*: 1818-1831.
- Gelzhäuser, P. et al., 1985. Erzeugung und Wirkung von UV-Strahlen. In: *Desinfektion von Trinkwasser durch UV-Bestrahlung*, 28-29.
- Hartman, Philip S., 1984. UV irradiation of wild type and radiation-sensitive mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*: fertilities, survival and parental effects. *Photochemistry and Photobiology*, vol. 39 (2): 169-175
- Ishii, N. and K. Suzuki, 1979. The killing effects of Ultraviolet Light and X-rays on Free-living nematode, *Rhabditidae tokai*. *J. Radiat. Res.* 21: 137-147.
- Kaplan, D.T. and E.L. Davis, 1990. Improved nematode extraction from carrot disk culture. *Journal of Nematology* 22 (3): 399-406.
- Klass, Michael R., 1977. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms of Ageing and Development* 6: 413-429.
- Moens, M. and G. Hendrickx, 1989. Sensivity of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles to UV-irradiation. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 54 (3b): 1187-1193.
- Qiu, J., B.B. Westerdahl, D. Giraud and C.A. Anderson, 1993a. Evaluation of hot water treatments for management of *Ditylenchus dipsaci* and fungi in Daffodil bulbs. *Journal of Nematology* 25(4): 686-694.
- Qiu, J., B.B. Westerdahl, R.P. Buchner and C.A. Anderson, 1993b. Refinement of hot water Treatment for management of *Aphelenchoides fragariae* in strawberry. *Journal of Nematology* 25(4S): 795-799.
- Runia, W., 1988. Milieubewust en economisch verantwoord omspringen met water: ontsmetting drainwater in recirculerende systemen. *Tuinderij*: 38-39.
- Runia, W. Th., 1990. Ontsmetting betrouwbaar bij voldoende behandelingsstijd: onderzoek inzake redoxpotentiaal ozonisatie. *Vakblad voor de Bloemisterij* 48: 85-60.
- Runia, W. Th., 1991. Betrouwbare ontsmetting (drain)water: verhitting en ozonisatie al op tientallen bedrijven. *Vakblad voor de Bloemisterij* 3: 20-22.
- Runia, W., 1992a. Drainwaterontsmetting met UV-licht geeft goed resultaat: onderzoek van proefstation in Naaldwijk wijst uit. *Vakblad voor de Bloemisterij* 10: 44-47.
- Runia, W., 1992b. Ontsmetting met lagedruk-UV is effectief. *Vakblad voor de Bloemisterij* 35: 50-51.
- Runia, W.Th. en S.J. Paternotte, 1993. Activators zetten waterstofperoxide aan het werk: nieuwe methode ontsmetting drainwater onderzocht. *Vakblad voor de Bloemisterij* 7: 44-45.
- Runia, W., 1998. Recirculatiewater verhitten met lagere temperatuur. *Groenten en Fruit/Glas-groenten* 28: 6-7.
- Southey, J.F., 1986. Cotton-wool filter method. In: Reference book 402, Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes, blz. 11.
- Stemerding, S., 1964. A blender-cottonwool filter method for collecting migratory endoparasitic nematodes from roots. Verslag Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, 141 (Jaarboek 1963), 170-175.
- Willers, H.C., J.M.G.P. Michiels en M.A. Bruins, 1997. Verwijdering van plantpathogenen uit recirculatiewater in gesloten teeltsystemen door langzame zandfiltratie. Resultaten 1995. IMAG-DLO, Wageningen Nota P 97-38 pp.52.

## GEPUBLICEERDE ARTIKELEN

- Amsing, J.J., 1995. Langzaam-zandfilter laat nog aaltjes door: drainwaterontsmetting tegen *Radopholus similis*. *Vakblad voor de Bloemisterij* 26: 43.
- Amsing, J.J. en W.Th. Runia, 1995. UV-licht maakt aaltjes onschadelijk: drainwaterontsmetting tegen *Radopholus similis*. *Vakblad voor de Bloemisterij* 21: 44-45.
- Amsing, J.J. en W.Th. Runia, 1995. Disinfestation of nematode-infested recirculation water by ultra-violet radiation. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 60/3b: 1087-1092.
- Amsing, J.J. en W.Th. Runia, 1996. Ozon en waterstofperoxide verliezen de strijd: drainwaterontsmetting tegen aaltjes. *Vakblad voor de Bloemisterij* 16: 33.
- Amsing, J.J., 1999. Wortelaaltjes krijgen het al snel te warm: onderzoek naar waterontsmetting toont effectiviteit van verhitting aan. *Vakblad voor de Bloemisterij* 29: 44-45.
- Amsing, J.J. en W.Th. Runia, 2000. Verhitting en UV-straling doen aaltjes het best de das om: manieren van waterontsmetting tegen aaltjes onderzocht. *Vakblad voor de Bloemisterij* (in druk).
- Amsing, J.J. en W.Th. Runia, 2000. Mogelijkheden van waterontsmetting tegen aaltjes onderzocht: verhitting en UV-straling effectief. *Groenten en Fruit/Glasgroenten* (in druk).
- Os, E. van, J. Amsing en W. Runia, 1997. Aaltjes ontsnappen aan langzaam zandfilter: zandfiltratie werkt anders dan gedacht. *Vakblad voor de Bloemisterij* 8: 44-45.
- Os, Erik van, Jan Amsing en Willemien Runia, 1997. Vers, fijn zand houdt Phytophthora al tegen. *Groenten en Fruit/Glasgroenten* 7: 18-19.
- Os, E. van, J. Amsing, W. Runia en F. van Kuik, 1997. Zandfilters zijn hulp bij het verwijderen van schimmelsporen uit gietwater. *De Boomkwekerij* 7: 24-25.
- Os, E.A. van, J.J. Amsing, A.J. van Kuik and H. Willers, 1999. Slow sand filtration: a potential method for the elimination of pathogens and nematodes in recirculating nutrient solutions from glasshouse-grown crops. *Acta Hort.* 481: 519-526.
- Runia, W.Th. and J.J. Amsing, 1996. Disinfestation of nematode-infested recirculation water by ozone and activated hydrogen peroxide. *ISOSC Proceedings 1996*: 381-393.
- Runia, W.Th. and J.J. Amsing, 1999. Disinfection of recirculation water from closed cultivation systems by heat treatment. *Acta Horticulturae* (in press).